

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT APEL MANALAGI
(*Malus sylvestris Mill*) DALAM MENCEGAH PENURUNAN AKTIVITAS SOD
(*SUPEROKSIDA DISMUTASE*) PLASENTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
BUNTING YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Nadya Mufty Ramadhani

NIM 155070601111028

**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN
JURUSAN KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

DAFTAR ISI

JUDUL	1
LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PERUNTUKAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI.....	2
DAFTAR GAMBAR.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR TABEL.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR LAMPIRAN	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR SINGKATAN.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 1 PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
1.3.1 Tujuan Umum.....	Error! Bookmark not defined.
1.3.2 Tujuan Khusus	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Manfaat Akademik.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Manfaat Praktis	Error! Bookmark not defined.
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Rokok.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Konsep Asap Rokok.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Kandungan asap rokok.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.3 Radikal Bebas pada Asap Rokok	Error! Bookmark not defined.
2.2 Antioksidan.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>).....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris Mill</i>)	Error! Bookmark not defined.
2.4.1 Karakteristik Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris Mill</i>). not defined.	Error! Bookmark

2.4.2 Kandungan Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris Mill</i>) ..	Error! Bookmark not defined.
2.5 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	Error! Bookmark not defined.
2.5.1 Karakteristik Tikus	Error! Bookmark not defined.
2.5.2 Siklus Reproduksi Tikus	Error! Bookmark not defined.
2.5.3 Implantasi dan Plasentasi.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN ..	Error! Bookmark not defined.
3.1 Kerangka Konsep.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1 Rancangan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2 Populasi dan Sampel	Error! Bookmark not defined.
4.2.1 Kriteria Inklusi.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.2 Kriteria Eksklusi.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel....	Error! Bookmark not defined.
4.3 Variabel Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.4.1 Lokasi Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.4.2 Waktu Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.3 Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.4 Bahan untuk Pemeriksaan SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>)	Error! Bookmark not defined.
4.5.5 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.5.6 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.

4.5.7	Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi	Error! Bookmark not defined.
4.5.8	Alat untuk Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi pada Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.5.9	Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.10	Alat Pembedahan dan Pengambilan Plasenta	Error! Bookmark not defined.
4.5.11	Alat untuk Pengukuran SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>)	Error! Bookmark not defined.
4.6	Definisi Operasional	Error! Bookmark not defined.
4.7	Prosedur Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.7.1	Adaptasi Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.7.1	Prosedur Pembuntingan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.7.2	Pembagian Kelompok Hewan Coba .	Error! Bookmark not defined.
4.7.3	Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi.....	Error! Bookmark not defined.
4.7.4	Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.7.5	Penentuan Dosis	Error! Bookmark not defined.
4.7.6	Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi pada Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.7.7	Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.7.8	Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Plasenta	Error! Bookmark not defined.
4.7.9	Pengukuran SOD	Error! Bookmark not defined.
4.8	Alur Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.9	Analisis Data	Error! Bookmark not defined.
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		Error! Bookmark not defined.
BAB 6 PEMBAHASAN		Error! Bookmark not defined.
BAB 7 PENUTUP		Error! Bookmark not defined.
7.1	Kesimpulan	Error! Bookmark not defined.
7.2	Saran	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA		Error! Bookmark not defined.

LAMPIRAN.....Error! Bookmark not defined.

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT APEL MANALAGI
(*Malus sylvestris* Mill) DALAM MENCEGAH PENURUNAN AKTIVITAS SOD
(SUPEROKSIDA DISMUTASE) PLASENTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
BUNTING YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

Oleh:

Nadya Mufty Ramadhani

NIM 155070601111028

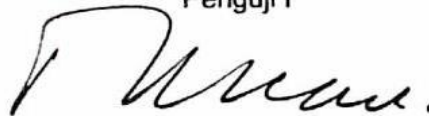
Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 15 April 2019

dan dinyatakan lulus oleh:

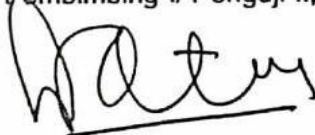
Penguji I



Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K)

NIK. 190148700

Pembimbing-I/ Penguji-II,



Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

NIK. 171152693

Pembimbing-II/ Penguji-III,



Rahma Dian H, SST, M.Keb

NIK. 2018028709212001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Kebidanan



Linda Rama Wati, SST, M.Kes
NIP. 198409132014042001

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT APEL MANALAGI
(*Malus sylvestris Mill*) DALAM MENCEGAH PENURUNAN AKTIVITAS SOD
(*SUPEROKSIDA DISMUTASE*) PLASENTA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
BUNTING YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Nadya Mufty Ramadhani

NIM 155070601111028

**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN
JURUSAN KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

DAFTAR ISI

JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERUNTUKAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Rokok.....	6
2.1.1 Konsep Asap Rokok.....	6
2.1.2 Kandungan asap rokok.....	7
2.1.3 Radikal Bebas pada Asap Rokok	8
2.2 Antioksidan.....	11
2.3 SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>).....	13
2.4 Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris Mill</i>)	17
2.4.1 Karakteristik Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris Mill</i>).....	17
2.4.2 Kandungan Apel Manalagi (<i>Malus sylvestris Mill</i>).....	18

2.5 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	20
2.5.1 Karakteristik Tikus	20
2.5.2 Siklus Reproduksi Tikus	21
2.5.3 Implantasi dan Plasentasi.....	22
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	24
3.1 Kerangka Konsep.....	24
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	27
4.1 Rancangan Penelitian	27
4.2 Populasi dan Sampel	28
4.2.1 Kriteria Inklusi.....	28
4.2.2 Kriteria Eksklusi.....	28
4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel.....	29
4.3 Variabel Penelitian	29
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	29
4.4.1 Lokasi Penelitian	29
4.4.2 Waktu Penelitian.....	29
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	30
4.5.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba.....	30
4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba.....	30
4.5.3 Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba.....	30
4.5.4 Bahan untuk Pemeriksaan SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>)	30
4.5.5 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba	30
4.5.6 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba	30
4.5.7 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi	31
4.5.8 Alat untuk Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi pada Hewan Coba	31
4.5.9 Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba.....	31
4.5.10 Alat Pembedahan dan Pengambilan Plasenta	31
4.5.11 Alat untuk Pengukuran SOD (<i>Superoksida Dismutase</i>)	31
4.6 Definisi Operasional	32
4.7 Prosedur Penelitian	33
4.7.1 Adaptasi Hewan Coba.....	33

4.7.1 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba	33
4.7.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba	33
4.7.3 Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi.....	34
4.7.4 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba	35
4.7.5 Penentuan Dosis	36
4.7.6 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi pada Hewan Coba	36
4.7.7 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba	36
4.7.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Plasenta	37
4.7.9 Pengukuran SOD	38
4.8 Alur Penelitian	40
4.9 Analisis Data	41
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	42
BAB 6 PEMBAHASAN	46
BAB 7 PENUTUP	52
7.1 Kesimpulan	52
7.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN.....	59

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok merupakan suatu permasalahan masyarakat yang dapat menimbulkan kerugian dari segi sosial, ekonomi maupun kesehatan yang dapat menyebabkan kematian. Seluruh dunia jumlah perokok mencapai 1,2 milyar orang, namun sekitar 800 juta orang berada di negara berkembang (Kemenkes RI, 2015). Tahun 2030 diperkirakan rokok akan membunuh lebih dari 8 juta orang diseluruh dunia (WHO, 2011). Menurut WHO (2011), Indonesia adalah negara dengan jumlah perokok terbesar ketiga setelah Cina dan India. Rokok tidak hanya berbahaya bagi perokok aktif namun juga sangat berbahaya bagi perokok pasif. Menurut Kemenkes RI (2015) berdasarkan Laporan Riset Kesehatan Dasar (2013) data jumlah kematian perokok pasif di Indonesia mencapai 25.000 orang akibat paparan asap rokok.

Asap rokok sangat berbahaya bagi tubuh. Ibu hamil rentan terpapar dengan radikal bebas dari sinar ultraviolet, radiasi, dan polutan seperti ozon (Grigorov, 2012). Ibu hamil juga rentan terpapar asap rokok dari lingkungan sekitar. Paparan asap rokok saat hamil berakibat terhadap efek buruk pada ibu dan janin seperti gangguan pertumbuhan janin, berat bayi lahir rendah, persalinan preterm, dan peningkatan kematian janin dan bayi (Hayfaa *et al.*, 2013). Asap rokok yang terhirup oleh ibu hamil yang mengandung radikal bebas di dalamnya akan masuk ke pernapasan menuju sirkulasi darah kemudian masuk ke dalam plasenta sehingga akan menimbulkan masalah pada kehamilan seperti disfungsi plasenta (Deshpande *et al.*, 2000).

Asap rokok mengandung sekitar 3500 senyawa kimia dan sebagian besar bersifat beracun, karsinogen atau mutagen (Valavanidis *et al.*, 2009). Racun yang berbahaya dalam asap rokok yaitu karbonmonoksida dan nikotin (Economides and Braithwaite, 1994). Paparan asap rokok dapat menyebabkan terjadinya radikal bebas. Radikal bebas adalah bahan kimia reaktif spesies yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya (Bhattacharya, 2015). Peningkatan radikal bebas dapat memicu reaksi berantai sehingga menghasilkan oksidasi makromolekul seperti ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Ziech *et al.*, 2011). Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan sistem biologis pada DNA, lipid dan protein (Lobo *et al.*, 2010). Dampak negatif radikal bebas terjadi stres oksidatif.

Stres oksidatif merupakan kondisi dimana jumlah radikal bebas dan antioksidan didalam tubuh jumlahnya tidak seimbang sehingga menyebabkan kerusakan sel (Lobo *et al.*, 2010). Saat hamil plasenta merupakan organ penting yang berfungsi sebagai pertukaran oksigen dan sebagai jalan masuknya nutrisi dari ibu ke janin (Sbrana, 2011). Apabila stres oksidatif ini terjadi pada plasenta maka akan menimbulkan terjadinya disfungsi endotel vaskular dan vasokonstriksi yang berakibat berkurangnya aliran darah ke plasenta (Cunningham, 2012; Sbrana, 2011). Agar radikal bebas dalam tubuh tidak meningkat, tubuh secara spontan akan memproduksi antioksidan (Khaira, 2010). Antioksidan yang diproduksi tubuh ada tiga yang terdiri atas SOD (*Superoksida Dismutase*), *glutation peroksidase* (GSH Px), dan katalase (Murray, 2003). SOD (*Superoksida Dismutase*) adalah antioksidan enzimatis yang bekerja melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif karena radikal bebas. SOD (*Superoksida Dismutase*) ini akan melawan radikal bebas dengan mengkatalis superoksida menjadi hidrogen peroksida (Grigorov, 2012). Penurunan aktivitas SOD plasenta ini terjadi ketika

paparan radikal bebas yang terus menerus dari luar tubuh sehingga menyebabkan jumlahnya masih berlebihan setelah tubuh mengeluarkan antioksidan primer SOD (*Superoksida Dismutase*) untuk menetralkan radikal bebas tersebut (Bender, 2009).

Antioksidan tersebut dapat diperoleh dari antioksidan non enzimatis yang berasal dari buah atau sayur. Apel direkomendasikan sebagai buah yang tinggi antioksidan (Chinnici *et al.*, 2004). Buah apel mengandung kadar flavonoid dalam jumlah tinggi (Wolfe and Liu, 2003). Varietas apel lokal (Manalagi) memiliki rata-rata kadar kuersetin lebih tinggi dibandingkan dengan apel impor (*Fuji* dan *Red delicious*) (Cempaka dkk., 2014). Apel manalagi juga jumlahnya cukup banyak sehingga mudah untuk didapatkan dan dimanfaatkan terutama di Jawa Timur khususnya Malang (Batu dan Poncokusumo) (Untung, 2006). Aktivitas antioksidan pada apel paling banyak terdapat pada kulit dibanding dengan daging buah (Wolfe and Liu, 2003). Salah satu flavonoid yang paling penting adalah kuersetin. Kulit apel diketahui mengandung kuersetin glikosida. Kuersetin ini dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak (Cempaka dkk, 2014). Diketahui dalam 100 gram buah apel, terkandung sekitar 4,42 mg kuersetin aglikon dan 13,2 mg kuersetin glikosida (Boyer and Liu, 2004). Terkait penggunaan antioksidan dari luar tubuh yang berasal dari apel terutama bagian kulit sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian mengenai kebenarannya dalam mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta yang dipaparkan rokok.

Berdasarkan masalah yang ada, maka akan dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting

yang dipapar asap rokok sehingga dapat mencegah stres oksidatif yang beresiko pada janin.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superdioksida Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dalam mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Membuktikan pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.
- 2) Menetapkan dosis efektif untuk mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu dan pengetahuan yang lebih luas mengenai antioksidan yang berasal dari kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) untuk menangkal radikal bebas.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan mampu menjadi dasar dalam pemanfaatan kulit apel sebagai antioksidan khususnya bagi ibu hamil.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok

2.1.1 Konsep Asap Rokok

Rokok adalah salah satu produk tembakau yang penggunaannya dengan cara dibakar dan dihisap asapnya atau dihirup asapnya yang dihasilkan dari tanaman *nicotiana tabacum*, *nicotinia rustica*, dan spesies lainnya atau sintesisnya yang asapnya mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan (PP RI No. 109, 2012).

Asap rokok adalah polutan yang menyebabkan radikal bebas. Kandungan asap rokok yang berbahaya yaitu nikotin, karbonmonoksida, akrolein, hidrokarbon polisiklik dan N-nitrosamin (Moritsugu, 2006). Asap rokok dari tembakau mengandung sekitar 3500 senyawa kimia dan sebagian besar bersifat beracun, karsinogen atau mutagen. Asap rokok ini dibagi menjadi 2 arus yang terdiri dari arus utama (*mainstream*) dan arus samping (*sidestream*) (Valavanidis *et al.*, 2009). Asap rokok arus utama (*mainstream*) berasal dari asap yang dihisap oleh perokok, sedangkan asap rokok arus samping (*sidestream*) merupakan asap rokok yang berada pada lingkungan yang memungkinkan dihirup oleh orang disekitar. Asap rokok arus samping ini akan terus menerus dihasilkan selama rokok menyala walaupun sedang tidak sedang dihisap (Ambrose *et al.*, 2004). Dengan demikian maka merokok tidak saja membahayakan bagi perokok itu sendiri (perokok aktif), tetapi juga bagi orang di sekitarnya (perokok pasif).

Asap rokok memiliki 2 fase yaitu fase gas dan fase partikel (tar). Fase partikel (tar) diketahui dapat masuk ke alveolus (Valavanidis *et al.*, 2009).

Fase gas terdiri dari karbon monoksida, asam hidrosianat, asetaldehid, akrolein, amonia, formaldehid, oksida dari nitrogen, nitrosiamin, hidrazin, dan vinil klorida. Sedangkan, partikel padat yang dihasilkan terdiri dari tar, hidrokarbon aromatik polinuklear, nikotin, fenol, kresol, logam, indol, karbazol, dan katekol (Syahdrajat, 2007).

2.1.2 Kandungan asap rokok

- a. Nikotin merupakan molekul aktif utama yang berasal dari daun *Nicotiana tabacom* yang ada dalam asap rokok. Dosis besar nikotin sangat beracun. Orang yang merokok beresiko mengalami penyakit kronis seperti emfisema, bronkitis, penyakit kardiovaskular, kanker, dan penyakit bronkopulmonalis (Taghavi *et al.*, 2012). Hasil penelitian sebelumnya juga menyebutkan kandungan nikotin pada asap rokok dapat masuk ke aliran darah janin dengan melewati plasenta (Luck *et al.*, 1985; Clark and Irion, 1992).
- b. Karbonmonoksida (CO) adalah sejenis gas yang tidak memiliki bau. Unsur ini dihasilkan oleh pembakaran yang tidak sempurna dari unsur zat arang atau karbon. Gas karbonmonoksida bersifat toksik. Gas CO yang dihasilkan sebatang rokok dapat mencapai 3-6%, sedangkan CO yang dihisap oleh perokok paling rendah sejumlah 400 ppm (*parts per million*) sudah dapat meningkatkan kadar karboksihemoglobin dalam darah sejumlah 2-16% (Sitepoe, 2000). Karbonmonoksida diketahui memiliki afinitas dengan hemoglobin sekitar dua ratus kali lebih kuat dibandingkan afinitas oksigen terhadap hemoglobin (Warnakulasuriya *et al.*, 2010).

- c. Tar adalah senyawa polinuklir hidrokarbon aromatika yang bersifat karsinogenik (PP RI No 81, 1999). Tar dapat merusak sel paru karena dapat lengket dan menempel pada jalan nafas dan paru-paru sehingga mengakibatkan terjadinya kanker. Saat rokok dihisap, tar akan masuk ke dalam rongga mulut dalam bentuk uap kemudian menjadi padat dan membentuk endapan berwarna coklat pada permukaan gigi, saluran pernafasan dan paru-paru (Sitepoe, 2000).

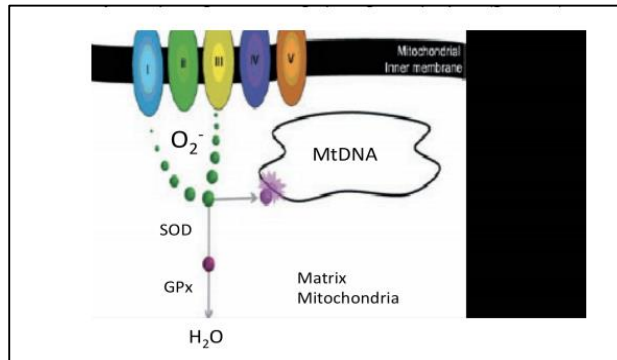
2.1.3 Radikal Bebas pada Asap Rokok

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan, bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat merusak jaringan. Radikal bebas memiliki reaktivitas yang tinggi disebabkan oleh jumlah elektron yang tidak berpasangan dan cenderung menarik pasangan dari senyawa lain sehingga menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang baru. Apabila radikal bebas berikatan dengan elektron dari protein, lemak, asam nukleat maka akan menyebabkan terjadinya perubahan yang mengakibatkan fungsi sel dapat terganggu (Winarsi, 2007). Diperkirakan dalam 1 kali hisapan rokok terdapat 1014 molekul radikal bebas atau oksigen yang reaktif (Legowo, 2015).

Sumber radikal bebas dapat dari lingkungan (eksogen) maupun endogen berasal dari dalam tubuh. Radikal bebas dari lingkungan dapat berupa polusi udara, alkohol, paparan sinar ultraviolet, asap rokok, asap dari pembakaran bahan bakar fosil dan obat-obatan tertentu seperti anestesi, pestisida, sinar X dan kemoterapi. Sumber radikal bebas endogen berasal dari metabolisme energi di mitokondria seperti peroksida dan juga berasal dari reaksi pernafasan, fagositosis, sintesis prostaglandin, serta dalam sistem

sitokrom P450. (Winarsi, 2007; Khaira, 2010). Tahap pembentukan radikal bebas dibagi menjadi 3 yaitu (Ardhie, 2011):

- 1) Tahap inisiasi: tahap awal dimana terjadi pembentukan radikal bebas.



Gambar 2. 1 Pembentukan ROS (Widayati, 2012)

- 2) Tahap propagasi: tahap pemanjangan rantai radikal bebas atau sering disebut sebagai reaksi berantai.
- 3) Tahap terminasi: adalah tahap dimana terjadi reaksi antara senyawa radikal yang satu dengan senyawa radikal yang lain. Reaksi radikal akan berhenti bila terdapat dua radikal yang saling bereaksi dan menghasilkan suatu spesies non radikal. Hal ini hanya dapat terjadi ketika konsentrasi spesies radikal sudah tinggi sehingga memungkinkan dua spesies radikal untuk saling bereaksi.

Perubahan oksigen yang dihirup oleh sel tubuh secara terus menerus akan berubah menjadi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Radikal bebas ROS (*Reactive Oxygen Species*) merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif. ROS (*Reactive Oxygen Species*) memiliki dua kelompok yang bersifat radikal dan non radikal. Kelompok radikal terdiri atas *superoxide anion*, *hydroxyl radicals*, dan *peroxyl radicals*. Kelompok non radikal terdiri dari hidrogen peroksida dan *organic peroxides* (Ardhie, 2011). Radikal bebas memiliki waktu paruh yang sangat singkat, karena setelah

terbentuk, komponen ini akan bereaksi dengan molekul lain. Waktu paruh ROS dipengaruhi oleh lingkungan seperti pH. ROS (*Reactive Oxygen Species*) bersifat sangat reaktif dan memiliki waktu paruh yang pendek, misalnya OH^\bullet dapat menyebabkan kerusakan langsung di tempat produksinya. Dalam mencegah interaksi antara radikal dengan target biologisnya, antioksidan harus berada dilokasi produksi untuk bersaing dengan radikal bebas. Radikal superoksid adalah 2 radikal superoksid yang membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) dan O_2 dengan bantuan enzim *Superoksida Dismutase*. Hidrogen peroksida dapat menyebabkan kerusakan sel pada konsentrasi yang rendah karena mudah larut dalam air dan mudah melakukan penetrasi ke dalam membran. Radikal hidroksil memiliki reaktivitas yang sangat tinggi, waktu paruh yang singkat dan daya ikat yang sangat besar terhadap molekul organik maupun anorganik, termasuk DNA, protein, lipid, asam amino, gula, dan logam (Kohen and Nyska, 2002).

Dampak negatif radikal bebas dapat terjadi stres oksidatif. Penyebab stres oksidatif dikarenakan jumlah radikal bebas dan antioksidan didalam tubuh jumlahnya tidak seimbang sehingga menyebabkan kerusakan sel (Lobo *et al.*, 2012). Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan jumlah radikal bebas berupa ROS (*Reactive Oxygen Species*) dengan antioksidan yang ada dalam tubuh (Hung, 2007). Resiko dari terjadinya stres oksidatif yaitu terjadinya kerusakan oksidatif. Saat hamil plasenta merupakan organ penting yang berfungsi sebagai pertukaran oksigen dan jalan masuknya nutrisi dari ibu ke janin (Sbrana, 2011). Apabila stres oksidatif terjadi pada plasenta maka akan menimbulkan terjadinya disfungsi endotel vaskular dan terjadi vasokonstriksi yang menyebabkan berkurangnya aliran darah ke plasenta

(Cunningham *et al.*, 2012; Sbrana, 2011). Jika jumlah radikal bebas dalam tubuh masih tersisa atau produksinya masih berlebihan setelah tubuh mengeluarkan antioksidan primer yaitu *Superoksida Dismutase* maka tubuh akan memerlukan antioksidan tambahan untuk menetralkan efek yang diakibatkan oleh ROS (Bender, 2009). Menurut Kevin *et al.* (2006) dan Valko *et al.* (2007), kerusakan oksidatif tersebut diakibatkan oleh radikal bebas yang akan menimbulkan keadaan patologis seperti kerusakan sel, jaringan, dan organ seperti hati, ginjal, jantung. Kerusakan ini dapat berakhir pada kematian sel sehingga terjadi percepatan timbulnya berbagai penyakit degeneratif. Penyakit lain yang dapat timbul akibat radikal bebas yaitu aterosclerosis, emfisema/bronkitis, penyakit *Parkinson*, distrofi, preeklamsia, kanker serviks, gagal ginjal akut, sindrom down, penyakit hati, penderita hemodialisis, diabetes, penuaan, gangguan serebrovaskular, dan cedera iskemia (Marks *et al.*, 2000).

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang dapat menghambat atau menghentikan terjadinya kerusakan oksidatif di dalam tubuh. Tubuh mengembangkan mekanisme perlindungan yang bertujuan untuk mencegah pembentukan oksidan dan peroksidasi lipid maupun memperbaiki kerusakan yang terjadi akibat bahaya dari radikal bebas. Antioksidan dalam sistem perlindungan dibagi atas antioksidan endogen yang terdiri atas enzim dan senyawa yang disintesis oleh tubuh, dan antioksidan ini juga dapat diperoleh dari bahan makanan (Winarsi, 2007).

Secara biologis, antioksidan dibagi menjadi 2 yaitu antioksidan enzimatis dan antioksidan non enzimatis. Antioksidan enzimatis adalah

antioksidan yang bekerja secara langsung menetralkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) atau RNS (*Reactive Nitrogen Species*) yang berupa antioksidan primer. Antioksidan non enzimatis dibagi menjadi 2 yaitu *metabolic antioxidants* dan *nutrient antioxidants*. *Metabolic antioxidants* merupakan hasil dari metabolisme tubuh seperti asam lemak, *glutathione*, *L-arginine*, koenzim Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, dan transferrin. *Nutrient antioxidants* merupakan komponen yang tidak dihasilkan oleh tubuh tetapi diperoleh dari makanan ataupun suplemen seperti vitamin C, vitamin E, karotenoid, selenium, mangan, zinc, flavonoid, asam lemak omega 3, dan omega 6 (Pham-Huy *et al.*, 2008). Berdasarkan kerjanya, antioksidan dikelompokkan menjadi 3 macam (Winarsi, 2007):

- 1) Antioksidan primer terdiri atas *Superoksida Dismutase* (SOD), katalase, dan *glutathione peroxidase*. Ketiga antioksidan ini berperan dalam mengurangi pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil. Antioksidan ini dapat mengubah radikal superoksida menjadi air.
- 2) Antioksidan sekunder terdapat di vitamin B, vitamin C, vitamin E, betakaroten dan senyawa-senyawa fitokimia. Antioksidan berfungsi dengan mengikat radikal bebas dan mencegah terjadinya amplifikasi radikal.
- 3) Antioksidan tersier terdiri atas enzim perbaikan DNA dan metionin sulfoksida reduktase.

Berdasarkan pencegahan terhadap dampak negatif yang ditimbulkan maka antioksidan dikelompokkan ke dalam 2 golongan yaitu (Murray, 2003):

1) Antioksidan Pencegah

Merupakan antioksidan yang dapat mencegah terbentuknya radikal yang paling berbahaya bagi tubuh yaitu radikal hidroksil.

2) Antioksidan Pemutus Rantai (*Chain Breaking*)

Merupakan zat yang dapat memutus rantai reaksi pembentukan radikal bebas asam lemak pada membran sel dan mencegah peroksidasi lemak sehingga tidak terjadi kerusakan sel.

Antioksidan bekerja melalui salah satu dari mekanisme berikut: Pertama, antioksidan menekan pembentukan ROS baik dengan cara menghambat kerja enzim maupun dengan mengikat logam kelumit yang terlibat dalam produksi radikal bebas. Kedua, antioksidan bekerja melalui pemadaman ROS. Ketiga, dengan cara melindungi antioksidan tubuh (Fukumoto and Mazza, 2000).

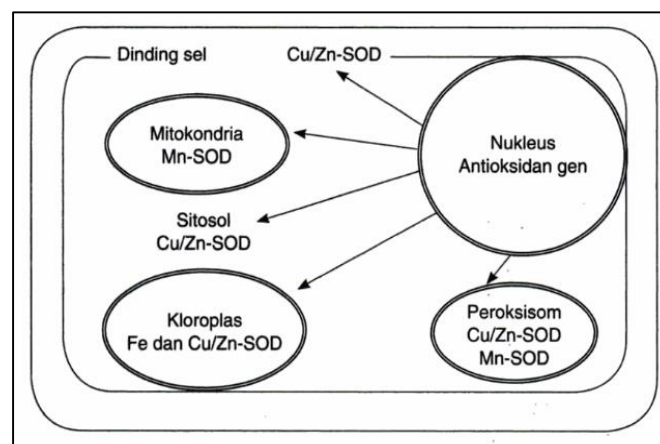
2.3 SOD (*Superoksida Dismutase*)

SOD (*Superoksida Dismutase*) adalah antioksidan enzimatis atau antioksidan endogenus. Enzim SOD berfungsi untuk melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas seperti anion peroksida. Enzim ini juga melindungi sel-sel tubuh dari peradangan yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007). Berdasarkan distribusi di dalam tubuh enzim SOD ini terbagi atas (Winarsi, 2007):

- 1) *Copper-Zinc Superoxide Dismutase* (Cu-Zn SOD) berada pada kloroplas, sitosol dan mungkin diluar sel. Cu-Zn SOD lebih banyak ditemukan dalam eukariot. Cu-Zn SOD disebut dengan SOD1. Enzim ini adalah homodimer yang terdapat sitoplasma eukariot, peroksisom, kloroplas, dan periplasma prokariot. Enzim ini berperan dalam sistem pertahanan terhadap oksidan.

Dalam Cu-Zn SOD, mineral Cu berfungsi untuk katalitik enzim, sedangkan Zn sebagai fungsi struktural. Cu-Zn SOD merupakan salah satu SOD yang paling stabil. Hal ini disebabkan oleh ikatan non-kovalen dan ikatan disulfida yang tergabung dalam setiap sub unit (Wresdiyati *et al.*, 2003).

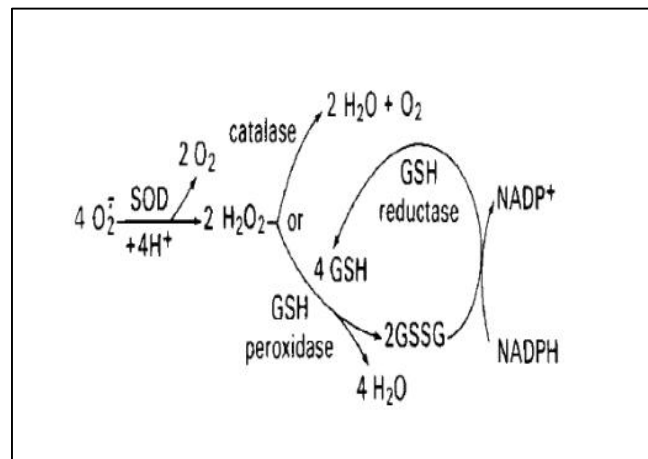
- 2) *Manganase Superoxide Dismutase* (Mn-SOD) biasanya berada pada mitokondria dan peroksisom. Mn-SOD bekerja dengan cara menarik muatan negatif radikal superoksida sehingga berubah menjadi sisi positif. Mn-SOD lebih berperan dalam pertahanan sel dalam menghadapi stress etanol (Costa *et al.*, 1997).
- 3) Ekstraseluler SOD (EC-SOD) dan besi SOD (Fe-SOD) berada hanya dikloroplas.



Gambar 2. 2 Jenis-jenis SOD (Winarsi, 2007)

Berdasarkan mekanismenya, enzim ini digolongkan sebagai antioksidan primer yang berperan mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. *Superoxida Dismutase* ini dibentuk ketika jumlah ROS tinggi dalam tubuh sebagai respon atas radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Apabila jumlah ROS yang ada didalam tubuh masih tersisa dan jumlahnya berlebihan

maka tubuh membutuhkan antioksidan tambahan yang berasal dari luar tubuh untuk meminimalisir jumlah ROS dalam tubuh (Bender, 2009). SOD terletak di dalam sitosol dan mitokondria (Werddhasari, 2014).



Gambar 2. 3 Cara kerja SOD (Menvielle-Bourg, 2005)

Enzim antioksidan utama yang secara langsung terlibat dalam menetralkan ROS adalah *Superoksida Dismutase* (SOD), katalase (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx) dan *glutathione reductase* (GRx). SOD merupakan garis pertahanan pertama melawan radikal bebas, mengkatalisis dismutasi radikal anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Oksidan yang terbentuk (H_2O_2) diubah menjadi air dan oksigen (O_2) oleh enzim katalase (CAT) atau *glutathione peroxidase* (GPx). Enzim seleno protein GPx menghilangkan H_2O_2 dengan menggunakannya untuk mengoksidasi reduksi glutathione (GSH) menjadi glutathione teroksidasi (GSSG). Glutathione reduktase, enzim flavoprotein, meregenerasi GSH dari GSSG, dengan NADPH sebagai sumber reduksi daya. Selain hidrogen peroksida, GPx juga mengurangi hidroperoksida lipid atau non lipid saat mengoksidasi glutathione (GSH) (Pham-Huy *et al.*, 2008). Dengan adanya

SOD (*Superoksida Dismutase*), kecepatan dismutasi meningkat lebih dari 1000 kali lipat dibandingkan dismutasi spontan (Miwa *et al.*, 2008).

Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) ini bisa dipengaruhi oleh beberapa faktor baik internal dan eksternal. Merokok merupakan salah satu faktor eksternal, selain itu juga disebabkan karena paparan sinar ultraviolet, aktifitas fisik, stres psikologi dan penggunaan obat seperti obat immunosupresan, obat anti inflamasi non steroid, serta penyakit sistemik kronis. Penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) dapat menyebabkan terjadinya beberapa kondisi dan penyakit, seperti reumatoid arthritis, anemia, infeksi saluran nafas, katarak dan infertil (Winarsi, 2007).

Penentuan aktivitas enzim SOD ini dapat dilakukan dengan mereaksikan xantin dengan enzim xantin oksidase untuk membentuk radikal bebas superoksida (O_2^-). Superoksida ini akan mereduksi NBT (*Nitroblue Tetrazollum*) menjadi formazan berwarna ungu kebiruan. Jumlah aktivitas SOD ini dapat dilihat melalui kepekatan warna semakin ungu kebiruan maka menunjukkan semakin tinggi absorbansi formazan dan semakin rendah aktivitas SOD. Semakin muda warna maka menunjukkan semakin rendah absorbansi formazan dan semakin tinggi aktivitas SOD. SOD dalam sampel akan berkompetisi dengan NBT untuk bereaksi dengan radikal superoksida yang akan menghambat pembentukan warna. Pembacaan SOD dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm. Satuan yang digunakan untuk menyatakan kadar SOD yaitu (U/100mg) (Amini, 2013).

2.4 Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*)

2.4.1 Karakteristik Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*)

Buah apel (*Malus sylvestris Mill*) merupakan tanaman yang berasal dari daerah subtropis. Tanaman buah apel biasanya tumbuh di daerah dengan ketinggian 700-1200 meter diatas permukaan laut, kering atau basah, namun tidak banyak turun kabut (Subagyo dan Zubaidi, 2010). Di Indonesia buah apel memiliki banyak jenis seperti *Rome Beauty*, Manalagi, *Anna*, *Princess Noble*, Wanglin/Lali Jiwo. Jawa Timur menjadi salah satu pusat budidaya buah apel yaitu Malang (Batu dan Poncokusumo), Pasuruan (Nongkojajar), selain itu juga sudah banyak ditemukan didaerah Situbondo, Banyuwangi, Jawa Tengah, Bali, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, dan Sulawesi Selatan. Setiap apel membutuhkan waktu yang berbeda-beda untuk proses pemanenan pada apel manalagi diperlukan waktu sekitar 114 hari, apel *Rome Beauty* 120-141 hari, sedangkan apel *Anna* sekitar 100 hari namun secara umumnya membutuhkan waktu sekitar 4-5 bulan (Untung, 2006).

Taksonomi buah apel manalagi terdiri atas:

Divisi : Spermatophyta (Tumbuhan Berbiji)

Sub divisi : Angiospermae (Berbiji Tertutup)

Kelas : Dicotyledone (Berkeping dua)

Ordo : Rosales

Family : Rosaceae

Genus : *Malus*

Spesies : *Malus sylvestris Mill*



Gambar 2. 4 Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*) (Anggraini, 2017)

Karakteristik apel manalagi ini memiliki bentuk bulat dengan diameter 4-7 cm dan berat 75-160 gram per buahnya (Mianti, 2010). Apel ini buahnya berwarna hijau muda kekuningan dengan aroma yang kuat dan sedap, sedangkan untuk bagian dagingnya renyah, sedikit air dan berwarna putih (Sufrida dkk, 2004).

2.4.2 Kandungan Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*)

Apel memiliki kandungan antioksidan yaitu senyawa flavonoid. Flavonoid adalah senyawaan fenolik yang diisolasi dari berbagai bagian dari tanaman. Sampai saat ini, telah berhasil diisolasi lebih dari 8.000 jenis senyawaan flavonoid (Pietta, 2000). Pada tanaman, flavonoid memiliki beragam fungsi. Diantaranya dapat berfungsi sebagai antioksidan, anti mikrobial, fotoreseptor, atraktor visual, dan skrining cahaya. Flavonoid terutama berada dalam bentuk turunan glikosilat. Kandungan fenolik dan flavonoid paling banyak terdapat dalam kulit apel, kemudian diikuti daging-kulit, kemudian daging buah. Flavonoid dapat bertindak sebagai antioksidan melalui dua mekanisme, yaitu (Lee *et al.*, 2003):

- 1) Flavonoid menghambat kerja enzim yang terlibat dalam reaksi produksi anion superoksida, flavonoid juga mengikat logam kelumit yang terlibat

dalam reaksi yang menghasilkan radikal bebas. Flavonoid ini akan menghentikan radikal dengan jalan mereduksi radikal superoksida, peroksil, alkoksil, dan hidroksil. Radikal aroksil saling bereaksi menghasilkan quinon yang stabil.

- 2) Flavonoid menghentikan radikal dengan cara menyediakan sisi untuk pengikatan radikal bebas. Sisi tersebut yaitu gugus katekol pada cincin B yang merupakan donor elektron yang baik.

Flavonoid sebagai antioksidan yang mampu menghambat enzim yang terlibat dalam ROS. Flavonoid memiliki kemampuan untuk mereduksi sehingga dapat mengurangi radikal bebas seperti superoksida, peroksil, alkoksil, dan radikal hidroksi (Kumar and Pandey, 2013). Kandungan senyawa fenolik dalam buah apel adalah kuersetin glikosida, prosianidin B2, asam klorogenat, epikatekin, dan floretin glikosida. Bagian kulit apel memiliki kandungan kuersetin glikosida yang tinggi sebagai antioksidan. Kuersetin diketahui memiliki aktivitas paling besar karena di dalam strukturnya terdapat O-hidroksi dalam cincin B yang akan meningkatkan kestabilan bentuk radikal aroksil. Kuersetin dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak (Cempaka dkk, 2014). Kuersetin juga mampu menekan radikal bebas pada tahap pembentukan ion superoksida, pembentukan radikal bebas dari reaksi Fenton, dan pembentukan radikal peroksi lipid (Lankhanpal and Rai, 2007). Diketahui dalam 100 gram buah apel, terkandung sekitar 4,42 mg kuersetin aglikon dan 13,2 mg kuersetin glikosida (Boyer and Liu, 2004). Dalam 100 gram apel dengan kulitnya terdapat sekitar 14,84 mg flavonoid dimana 27% diantaranya adalah kuersetin (Bhagwat *et al.*, 2011).

Tabel 2. 1 Kandungan gizi 100 gram apel (Margantan, 2001, Sa'adah dkk, 2004)

Kandungan	Kadar
Energi	58,00 kal
Karbohidrat	14,90 gram
Kalsium	6,00 mg
Fosfor	10,00 mg
Besi	1,30 mg
Serat	0,70 mg
Vitamin A	24,00 rpe
Kadar asam	0,32 gram
Vitamin C	6,60 mg
Glukosa	3,72 gram
Sukrosa	4,54 gram
Aktivitas antioksidan	6,53 gram
Fruktosa	4,5 gram
Total gula	8,29 gram

Tabel 2. 2 Kandungan fitokimia apel dalam 100 gram (Lee *et al.*, 2003)

Kandungan	Kadar
Kuersetin glikosida	13.2 mg
Prosianidin B2	9.35 mg
Asam klorogenat	9.02 mg
Epikatekin	8.65 mg
Floretin glikosida	5.59 mg
Vitamin C	12.8 mg

2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*)

2.5.1 Karakteristik Tikus

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah hewan yang sering digunakan dalam percobaan selama penelitian. Secara genetik tikus putih dan manusia memiliki banyak kemiripan. Tikus putih memiliki 3 galur yang digunakan dalam hewan percobaan yaitu *wistar*, *long evans* dan *Sprague dawley* (Malole dan Promono, 1989). Tikus galur *wistar* memiliki kepala besar, ekor pendek, telinga panjang, sedangkan galur *long evans* memiliki bulu pada bagian kepala dengan bagian tubuh depan berwarna hitam dan ukuran tubuh lebih kecil

(Malole dan Pramono, 1989; Alexandru, 2011). Tikus wistar adalah tikus keturunan tikus albino termasuk spesies *Rattus norvegicus* (Alexandru, 2011).

Taksonomi Tikus Putih (Samsuria, 2009):

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*



Gambar 2. 5 Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar (Samsuria, 2009)

2.5.2 Siklus Reproduksi Tikus

Tikus merupakan spesies poliestrus yang memiliki siklus berulang-ulang sepanjang tahun. Tikus menyerupai mamalia besar yang memiliki generasi pendek dan ukuran yang kecil sehingga akan memudahkan dalam proses pemeliharaan dan pemberian konsumsi makanan yang efisien. Tikus dewasa dicapai saat usia 3-4 bulan. Tikus biasanya kawin pada umur 8-9 minggu. Waktu kawin tikus dilakukan pada masa estrus. Siklus estrus tikus berlangsung dalam waktu 4-6 hari dan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor

antara lain cahaya, suhu, nutrisi, dan hubungan sosial (Turner & Bagnara, 1976). Fase reproduksi dapat dikenali melalui apusan vagina. Terdapat 5 fase dalam siklus tikus yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Samsuria, 2009).

- 1) Proestrus: folikel ovarium tumbuh menjadi folikel de graaf dibawah pengaruh hormon FSH. Fase ini berlangsung 12 jam.
- 2) Estrus: fase dimana hewan betina telah mampu berkopulasi dan dapat menerima hewan jantan. Fase ini berlangsung 12 jam. Pada fase ini hormon estrogen meningkat sehingga aktivitas hewan tinggi, telinganya bergerak-gerak dan punggung lordosis. Ovulasi terjadi menjelang akhir siklus estrus.
- 3) Metestrus: fase dimana corpus luteum tumbuh lebih cepat dari sel granulosa yang telah dipecah yang dipengaruhi oleh hormon LH. Fase ini berlangsung 6-15 jam.
- 4) Diestrus: fase terpanjang pada siklus estrus. Fase ini berlangsung 60-70 jam. Fase ini kontraksi akan menurun, endometrium menebal, kelenjar-kelenjar mengalami hipertropi, mukosa vagina menipis.

2.5.3 Implantasi dan Plasentasi

Tikus laboratorium lebih cepat dewasa dibandingkan dengan tikus liar, tidak memperlihatkan perkawinan musiman dan umumnya lebih mudah berkembangbiak (Smith & Mangkoewidjojo, 1988). Apabila tikus melakukan perkawinan dan terjadi fertilisasi maka dalam tubuh tikus akan terjadi masa implantasi dan masa plasentasi, masa implantasi adalah proses bersarangnya blastosis di dalam rahim, sehingga terjadi hubungan antara selaput ekstra embrionik dan selaput lendir rahim yang terjadi pada hari ke 4 sampai hari ke

6 kebuntingan (Sukra, 1999), sedangkan masa plasentasi adalah masa dimana plasenta sudah terbentuk didefinisikan sebagai masa terbentuknya zona yang berbatasan dan memiliki vaskularisasi yang tinggi yang menghubungkan antara induk dan embrio. Periode awal plasenta dimulai hari ke 9 dan 10 pada tikus proses plasentasi terjadi kira-kira pada usia kebuntingan 12 hari yang diperlihatkan oleh tingginya konsentrasi laktogen plasenta dalam serum induk. Istilah plasentasi mencakup implantasi, pembentukan embrio dan terjalinnya hubungan antara induk dan fetus selama kebuntingan (Sukra, 1999).

Tabel 2. 3 Fisiologis tikus putih (*Rattus norvegicus*)

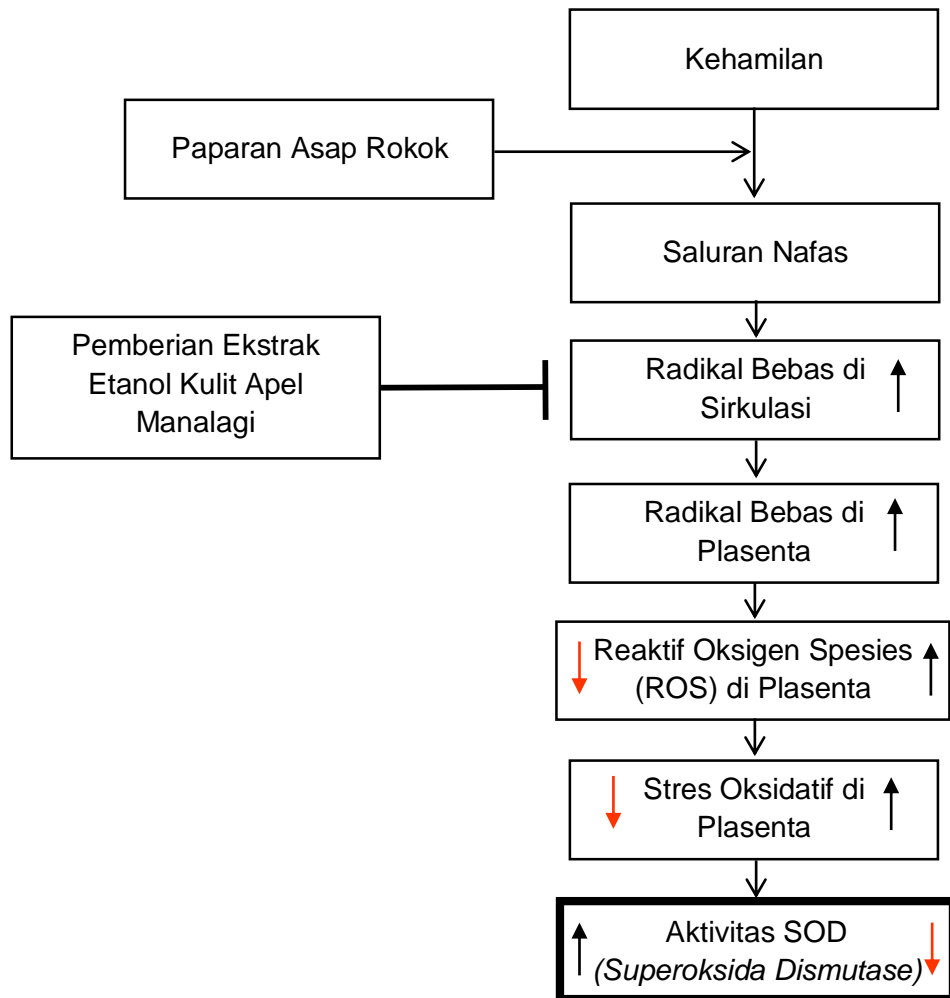
(Smith & Mangkoeridjojo, 1988; Wolfenshon dan Lloyd, 2013)

Nilai Fisilogis	Kadar
Kebutuhan makan	5-10g/100g BB
Jangka hidup	3-4 tahun
Temperatur rektar	36°-40° C
Lama kebuntingan	20-22 hari
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	40-60 hari
Umur dikawinkan	10 minggu
Jumlah anak	Rata-rata 9 maksimal 20 ekor
Bobot lahir	5-6 gram

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

—| : Menghambat

▮ : Variabel yang diteliti

□ : Variabel yang tidak diteliti

↑↓ : meningkat dan menurun

Keterangan kerangka konsep:

Asap rokok sangat berbahaya bagi tubuh. Asap rokok sangat beracun dan karsinogen. Diketahui di dalam asap rokok mengandung radikal bebas dalam jumlah besar. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan, yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif. Ibu yang hamil akan rentan terpapar asap rokok. Asap rokok yang terhirup oleh ibu hamil akan masuk ke dalam sistem pernapasan kemudian radikal bebas akan menuju ke sirkulasi darah dilanjutkan masuk ke dalam plasenta. Peningkatan radikal bebas dapat memicu terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*). Ketika jumlah ROS pada plasenta tinggi maka akan beresiko terjadinya stres oksidatif. Penyebab stres oksidatif ini dikarenakan jumlah radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh jumlahnya tidak seimbang, maka dengan ini tubuh secara spontan akan memproduksi antioksidan berupa enzim SOD (*Superoksida Dismutase*) sebagai antioksidan enzimatik. SOD (*Superoksida Dismutase*) ini akan melawan radikal bebas dengan mereduksi superoksida menjadi hidrogen peroksida. Tubuh apabila terpapar radikal bebas secara terus menerus maka antioksidan berupa SOD (*Superoksida Dismutase*) jumlahnya akan menurun, sehingga tubuh memerlukan antioksidan tambahan untuk mencegah efek buruk dari meningkatnya ROS dan juga mencegah penurunan aktivitas SOD pada plasenta.

Apel merupakan salah satu buah yang memiliki antioksidan tinggi berupa flavonoid. Aktivitas antioksidan pada apel paling banyak terdapat pada kulit yang mengandung kuersetin glikosida. Kuersetin ini diketahui dapat menangkal radikal bebas dari asap rokok. Kulit apel ini diberikan secara per oral kemudian akan masuk diabsorpsi ke sirkulasi darah untuk menghambat radikal bebas selanjutnya akan didistribusikan ke plasenta untuk menjadi antioksidan tambahan dalam

mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta yang turun akibat radikal bebas dari asap rokok. Maka dengan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta pada tikus bunting yang dipapar asap rokok.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan rancangan penelitian menggunakan *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Hewan coba pada penelitian ini akan diberikan paparan asap rokok kretek pada tikus *Rattus norvegicus* bunting. Pada penelitian ini akan dibagi menjadi 2 kelompok yang terdiri kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dibagi menjadi 2 yang terdiri atas kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol negatif (K-) adalah kelompok tikus bunting yang tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi. Sedangkan, kelompok kontrol positif (K+) adalah kelompok tikus bunting yang dipapar asap rokok tetapi tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 yaitu perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Tiap kelompok ini terdiri dari 5 tikus bunting. Kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 masing-masing kelompok akan dipapar asap rokok 1 batang/hari dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi per oral menggunakan sonde dengan dosis 7 mg/kgBB, 14 mg/kgBB, 28 mg/kgBB. Ekstrak etanol kulit apel manalagi diberikan mulai hari ke-6 hingga hari ke-18 kebuntingan. Pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta dilakukan pada hari ke-19 kebuntingan. Penilaian dilakukan dengan cara membandingkan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus bunting kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

4.2 Populasi dan Sampel

Hewan coba pada penelitian ini menggunakan jenis tikus betina *Rattus norvegicus* galur wistar bunting. Tikus diperoleh dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Perkiraan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah pengulangan (n) untuk masing-masing perlakuan (p) yang dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) dengan p = 5 adalah:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Hasil perhitungan diatas didapatkan data minimal 4 kali pengulangan untuk masing-masing kelompok. Penelitian ini menggunakan tikus bunting sebanyak 5 ekor pada masing-masing kelompok. Jadi, keseluruhan jumlah ekor tikus yang diperlukan dalam penelitian adalah $5 \times 5 = 25$ ekor tikus.

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus betina *Rattus norvegicus* galur wistar bunting
- b. Berat badan tikus 150-200 gram
- c. Usia 8-12 minggu
- d. Tikus dalam kondisi sehat dengan nafsu makan baik dan pergerakan aktif

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Terlalu cepat melahirkan (prematur)

- b. Tikus kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan subjek penelitian digunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) dalam pengelompokan dan pemberian perlakuan dengan teknik randomisasi sederhana. Metode ini dianggap cocok digunakan karena hewan coba, bahan pakan dan bahan penelitian bersifat homogen menggunakan teknik RAL (Rancangan Acak Lengkap). Hewan coba pada metode ini memiliki peluang sama untuk digunakan sebagai sampel dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

4.3 Variabel Penelitian

- 1) Variabel tergantung: aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting.
- 2) Variabel bebas: kandungan dalam paparan asap rokok dan ekstrak etanol kulit apel manalagi dalam 3 dosis.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan selama kurang lebih 2 bulan.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Makanan hewan coba adalah makanan ternak pelet BR 1, sedangkan minuman hewan coba adalah air keran.

4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

Asap rokok yang berasal dari rokok kretek. Rokok kretek yang digunakan diproduksi dengan mesin dan diperoleh dari pasar daerah Kota Malang. Ekstrak etanol kulit apel yang digunakan jenis apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) yang diambil bagian kulitnya. Kulit apel diperoleh dari daerah Bumiaji, Kota Batu Malang.

4.5.3 Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba

Bahan yang digunakan untuk pembedahan yaitu obat anastesi ketamin 0,1 cc.

4.5.4 Bahan untuk Pemeriksaan SOD (*Superoksida Dismutase*)

Xantin, Xantin Oksidase, PBS (*Phosfat Buffer Saline*), NBT, EDTA.

4.5.5 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Alat untuk pemeliharaan hewan coba adalah kandang tikus yang berupa box plastik ukuran 45 x 35 x 12 cm sejumlah 5 buah yang diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat berjaring, diberikan tempat makan dan minum tikus. Setiap kandang berisi 5 ekor tikus bunting.

4.5.6 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Alat yang digunakan untuk penimbangan berat badan hewan coba adalah Neraca Digital Analitik (gram).

4.5.7 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol kulit apel adalah pisau, wadah, oven, *rotary evaporator*, blender, timbangan, kertas saring, *water bath*, botol plastik/kaca, *freezer*.

4.5.8 Alat untuk Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi pada Hewan Coba

Pemberian ekstrak kulit apel manalagi menggunakan sonde dan *sprit* tanpa jarum 3 ml.

4.5.9 Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Alat pemaparan asap rokok menggunakan *smoking pump* milik Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Alat ini berbentuk kotak yang terbuat dari *fiberglass* yang memiliki 3 ruangan yang masing-masing berukuran 26 x 12 x 12 cm. Setiap ruangan terdapat pipa sebagai pengalih asap rokok. Ketiga pipa tersebut keluar menyatu dengan pipa yang dipasang rokok. *Smoking pump* ini juga terdapat pompa yang berfungsi sebagai penghisap rokok dan terdapat dua klep yang dapat membuka dan menutup secara otomatis saat penutupan dan penghisapan asap rokok yang keluar masuk.

4.5.10 Alat Pembedahan dan Pengambilan Plasenta

Kapas, scalpel, gunting, pinset, jarum pentul, alas kayu dan *handscoon*, wadah tempat plasenta.

4.5.11 Alat untuk Pengukuran SOD (*Superoksida Dismutase*)

Pipet, timbangan, centrifuge, tabung reaksi, water, spektrofotometer, vortex, micropipette, *glass wool*, seperangkat tabung reaksi.

4.6 Definisi Operasional

1) Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar bunting dengan usia 8-12 minggu dan berat badan 150-200 gram.

2) Tikus Bunting

Tikus bunting adalah tikus betina yang dikawinkan dengan tikus jantan yang menunjukkan tanda-tanda kebuntingan seperti *vaginal plaque* yang terdiri dari gumpalan air mani tikus jantan pada vagina tikus betina. Hari ke 12 kebuntingan pada abdomen dapat dilakukan palpasi.

3) Usia Kebuntingan

Usia kebuntingan tikus dihitung dari pertama kali muncul sumbatan vagina (*vaginal plaque*) sampai hari ke-18. Pengecekan dilakukan dengan *vaginal plaque* dan *vaginal swab*.

4) Asap rokok

Pemaparan asap rokok dimulai pada hari-6 hingga hari-18 menggunakan rokok kretek yang dipaparkan dengan alat *smoking pump* milik Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Paparan asap rokok diberikan setiap hari 1 batang selama 7,5 menit.

5) Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

Apel manalagi yang diambil yaitu bagian kulit, kemudian diolah dengan proses dicuci, dioven dan ditambah beberapa bahan lainnya untuk menjadi ekstrak. Apel yang digunakan yaitu apel manalagi yang ada di daerah Kota Batu Malang.

6) SOD (*Superoksida Dismutase*)

SOD (*Superdioksida Dismutase*) merupakan antioksidan enzimatis yang dapat diukur menggunakan metode NBT (*Nitroblue tetrazolium*). Satuan konsentrasi SOD dinyatakan dalam U/100mg. Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) yang diukur dari plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi hewan coba dilakukan minimal selama 7 hari terhadap kondisi air, suhu dan makanan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

4.7.1 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba

Pembuntingan dilakukan ketika tikus betina mengalami masa estrus. Pengawinan hewan coba ini dilakukan dengan mencampurkan hewan jantan dan betina dengan perbandingan 1:1 dalam 1 kandang. Tikus jantan dimasukkan ke kandang tikus betina pada siang hari dan dipisahkan pada pagi hari. Keesokan harinya jika ditemukan *vaginal plaque* maka hari tersebut dinyatakan sebagai hari pertama kebuntingan tikus. Tikus yang sudah bunting diberi label dan dimasukkan kedalam kelompok yang telah ditentukan, sedangkan tikus yang belum bunting dicampur kembali dengan tikus jantan.

4.7.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan 25 ekor tikus bunting kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus bunting. Rinciannya sebagai berikut:

1) Kelompok Kontrol

- a. Kelompok kontrol negatif (K-): tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi.
- b. Kelompok kontrol positif (K+): dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi.

2) Kelompok Perlakuan

- a. Kelompok Perlakuan 1 (P1): dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 7 mg/kgBB.
- b. Kelompok Perlakuan 2 (P2): dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 14 mg/kgBB.
- c. Kelompok Perlakuan 3 (P3): dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 28 mg/kgBB.

4.7.3 Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

Pembuatan ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) diawali dengan:

a. Proses Pengeringan

- 1) Cuci kulit buah apel 5000 gram hingga bersih
- 2) Kulit apel dipotong kecil-kecil
- 3) Kulit apel dioven pada suhu 40°-60° C atau dilakukan pengeringan dibawah sinar matahari

b. Proses Ekstraksi

- 1) Setelah kering kemudian diblender sampai menjadi bubuk halus 1000 gram
- 2) Bubuk halus kemudian ditimbang sebanyak 200 gram

- 3) Kemudian dilakukan perendaman dengan etanol sampai dengan 1 liter
 - 4) Kemudian dikocok selama 30 menit lalu direndam 1 malam sampai mengendap
 - 5) Ambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif
 - 6) Ulangi langkah 4 dan 5 sebanyak 3 kali
- c. Proses Evaporasi
- 1) Kemudian masukan ke dalam labu evaporasi dipasangkan pada evaporator
 - 2) Setelah itu isi *water bath* hingga penuh, suhu *water bath* diatur sampai 90° C atau sesuai dengan titik didih pelarut
 - 3) Semua alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik
 - 4) Pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif
 - 5) Aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung selama (\pm 1,5-2 jam) sampai dengan 1 liter.
 - 6) Setelah itu diperoleh hasil ekstrak sekitar 1/5 bagian dari bahan kering (40 gram dalam bentuk pasta)
 - 7) Hasil ekstrak dimasukkan ke botol plastik/kaca dan disimpan dalam *freezer*

4.7.4 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba dipelihara dan diadaptasikan dengan kondisi di laboratorium minimal selama 7 hari pada suhu ruangan yang konstan. Hewan coba dipelihara di box plastik berukuran 45 x 35 x 12 cm, masing-masing diisi 5 ekor tikus, ditutup dengan kawat dan diberi alas sekam yang diganti setiap 2 kali dalam 1 minggu. Makanan yang diberikan yaitu 40 g/hari/kandang.

4.7.5 Penentuan Dosis

Dosis berdasarkan penelitian yang dilakukan Suparmi, dkk (2014) tentang uji aktivitas ekstrak etanol kulit apel terhadap penurunan permeabilitas vaskuler pada mencit putih jantan strain balb/c terbukti menurunkan permeabilitas vaskuler pada mencit. Penelitian ini diperoleh hasil yang efektif dan signifikan sebesar 0,2 mg/20gBB, 0,4 mg/20gBB, 0,8 mg/20gBB mencit. Berdasarkan penelitian diatas peneliti akan menggunakan hewan coba tikus bunting sehingga perlu dikonversikan menggunakan tabel konversi Laurence and Bacharach (1964), maka dosis pertama menjadi $0,2 \text{ mg/20gBB} \times 7 = 1,4 \text{ mg/200gBB}$ atau 7 mg/kgBB , dosis kedua $0,4 \text{ mg/20gBB} \times 7 = 2,8 \text{ mg/200gBB}$ atau 14 mg/kgBB , dosis ketiga $0,8 \text{ mg/20gBB} \times 7 = 5,6 \text{ mg/200gBB}$ atau 28 mg/kgBB .

4.7.6 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi pada Hewan Coba

Ekstrak etanol kulit apel manalagi yang diencerkan menggunakan aquades diberikan secara per oral menggunakan sonde dan spuit tanpa jarum 3 ml yang dilakukan hari ke-6 hingga hari ke-18 kebuntingan. Pemberian ekstrak dilakukan setelah tikus bunting dipapar asap rokok pada hari yang sama.

4.7.7 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Paparan asap rokok dilakukan pada hari ke-6 hingga hari ke-18 kebuntingan dengan menggunakan 1 batang/hari selama 7,5 menit. Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus bunting sesuai dengan standar pemaparan asap rokok FKUB. Rinciannya sebagai berikut:

- 1) Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca digital analitik sebelum dipapar asap rokok
- 2) Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan sisa asap
- 3) Nikotin yang melekat di *smoking pump* dibersihkan terlebih dahulu
- 4) *Power* dan *self voltage* diperiksa
- 5) Rokok dipasang pada pipa sampai batas merah
- 6) Tiga ekor dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup
- 7) Setiap pemaparan asap rokok dilakukan selama 7,5 menit untuk 1 batang rokok, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semula
- 8) Setiap pemaparan berikutnya kotak selalu dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya
- 9) Pompa tetap dijalankan tanpa asap rokok untuk mengeluarkan sisa asap rokok
- 10) Tahap-tahap diatas diulang untuk kelompok tikus berikutnya

4.7.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Plasenta

Pada hari ke-19 dilakukan pembedahan kemudian diambil plasenta dan dilakukan pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) U/100mg. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus diterminasi dengan injeksi ketamin 0,1 cc pada paha secara IM. Kemudian dilakukan pembedahan dan pengambilan organ plasenta. Plasenta yang diperoleh disimpan terlebih dahulu didalam *freezer* sampai seluruh sampel (25 sampel) terkumpul, kemudian setiap kelompok diambil 200 mg selanjutnya dibawa ke Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya untuk dilakukan pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*). Bangkai induk tikus yang sudah tidak

digunakan dikubur dengan kedalaman tanah minimal 50 cm. Tikus yang sudah dilakukan pembedahan tidak digunakan maka dikubur dengan prosedur yang baik, dilakukan oleh petugas Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

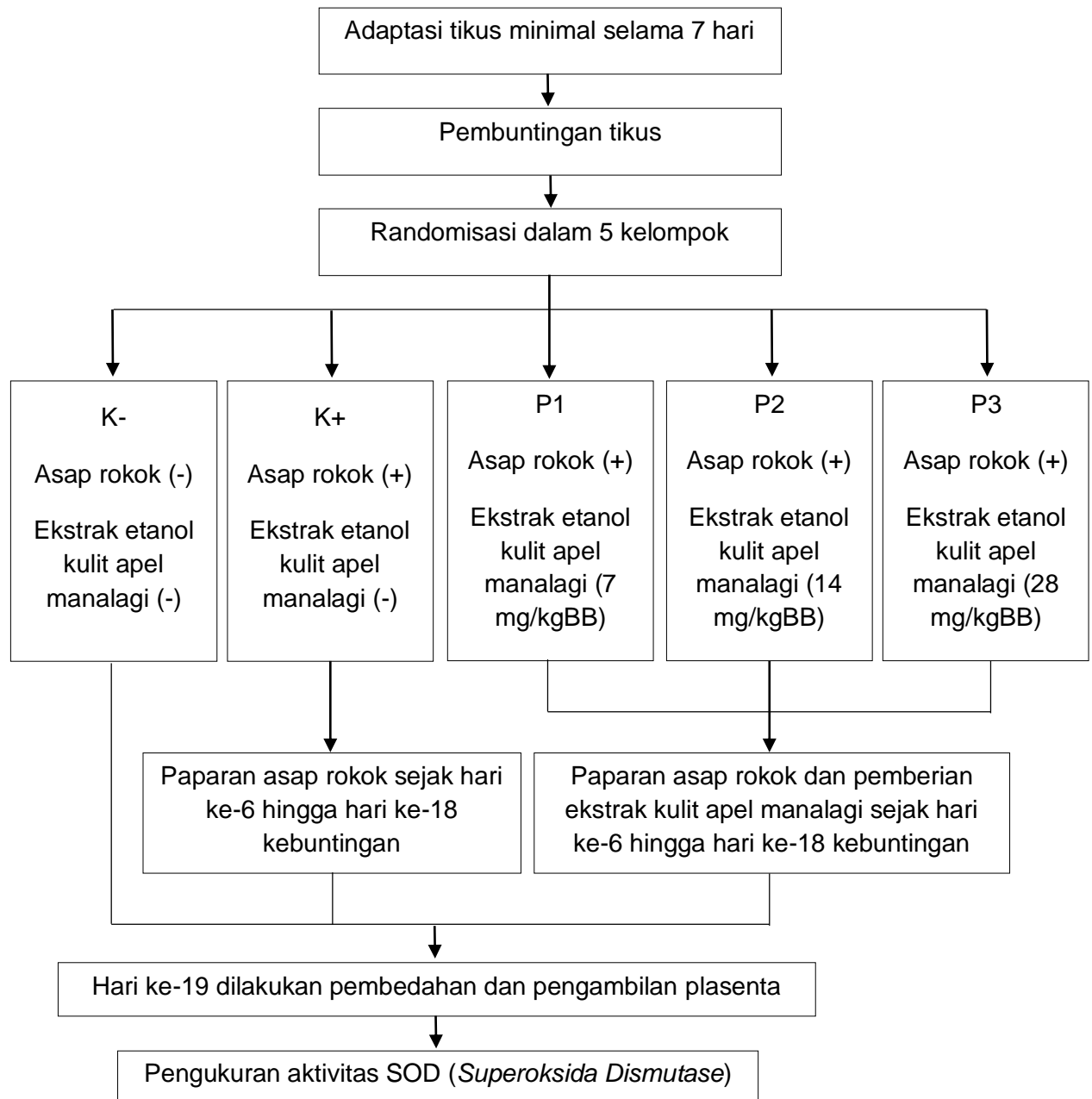
4.7.9 Pengukuran SOD

- 1) Timbang plasenta 200 mg untuk masing-masing kelompok
- 2) Homogenasi dengan buffer fosfat dan protease inhibitor sebanyak 2 cc
- 3) Sentrifuse 4000 rpm 4° C selama 15 menit
- 4) Ambil supernatant sampel 200 µl tambahkan EDTA 100 µl, NBT, Xantin 100 µl dan Xantin Oxidase 100 µl, tambahkan buffer fosfat
- 5) Kemudian inkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit
- 6) Sentrifuse atau saring dan tambahkan buffer fosfat hingga 3 cc
- 7) Ukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm

Penentuan aktivitas enzim SOD ini dapat dilakukan dengan mereaksikan xantin dengan enzim xantin oksidase untuk membentuk radikal bebas superoksida (O_2^-). Superoksida ini akan mereduksi NBT (*Nitroblue Tetrazollum*) menjadi formazan berwarna ungu kebiruan. Jumlah aktivitas SOD ini dapat dilihat melalui kepekatan warna semakin ungu kebiruan maka menunjukkan semakin tinggi absorbansi formazan dan semakin rendah aktivitas SOD. Semakin muda warna maka menunjukkan semakin rendah absorbansi formazan dan semakin tinggi aktivitas SOD. SOD dalam sampel akan berkompetisi dengan NBT untuk bereaksi dengan radikal superoksida yang akan menghambat pembentukan warna.

Pembacaan SOD dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Skema Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) dianalisa secara statistik menggunakan program SPSS 23,0 for windows dengan tingkat signifikan sebesar 0,05 ($p < 0,05$) dan taraf kepercayaannya sebesar 95% ($\alpha = 0,05$). Berikut merupakan langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif:

- 1) Uji normalitas data: bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat normal atau tidak. Apabila data terdistribusi secara normal maka menggunakan mean dan standar deviasi. Pengujian data menggunakan uji parametrik jika data yang diperoleh penyebarannya normal.
- 2) Uji homogenitas varian: uji ini bertujuan untuk menguji *Anova* yang dilakukan berlaku atau tidak. Jika varian yang digunakan homogen maka menggunakan uji parametrik *Anova* dapat dilakukan.
- 3) Uji *One Way Anova*: uji ini bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui minimal terdapat dua kelompok yang berbeda secara signifikan.
- 4) Uji *Post Hoc Test*: uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil uji *Anova*. Uji *Post Hoc Test* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD* dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0,05$).
- 5) Uji korelasi *Pearson*: uji ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kelompok yang berbeda secara signifikan hasil dari uji *post hoc (Tukey HSD)*.

BAB 5

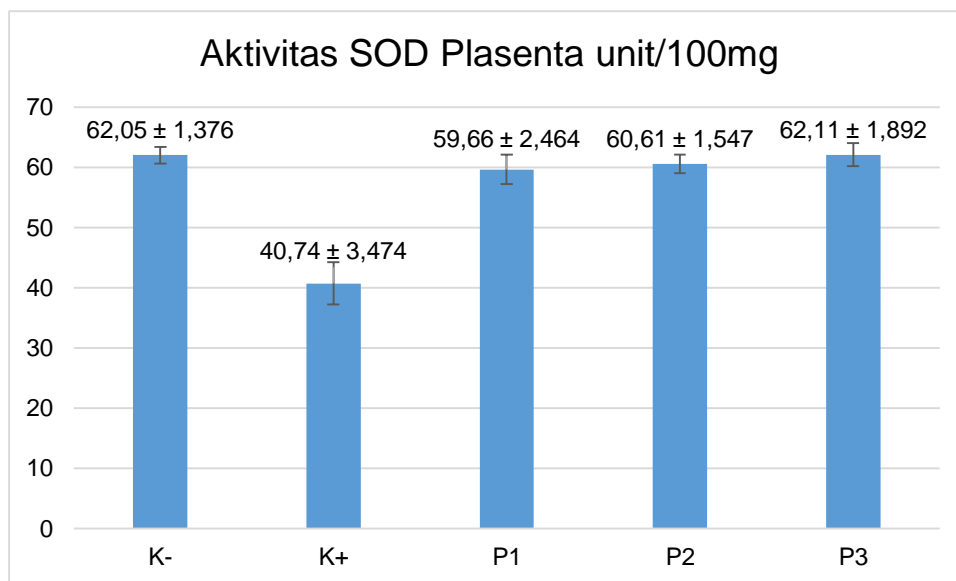
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan 25 sampel yang dibagi menjadi 5 kelompok, terdiri atas kontrol negatif (K-) adalah kelompok tikus bunting tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi, kontrol positif (K+) adalah kelompok tikus bunting yang dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi, perlakuan 1 (P1) adalah kelompok tikus bunting yang dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 7 mg/kgBB/hari, perlakuan 2 (P2) adalah kelompok tikus bunting yang dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 14 mg/kgBB/hari, perlakuan 3 (P3) adalah kelompok tikus bunting yang dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 28 mg/kgBB/hari. Paparan asap rokok dan pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi dilakukan mulai hari ke-6 hingga ke-18 kebuntingan, kemudian dilakukan pembedahan untuk dilakukan pengambilan plasenta. Selanjutnya, plasenta tikus akan diukur aktivitas SOD. Hasil pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) adalah sebagai berikut:

Tabel 5. 1 Hasil Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) Plasenta terhadap Pengaruh Paparan Asap Rokok dan Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

Kelompok	(n)	Aktivitas SOD (unit/100mg)	Nilai p
		Rata-rata Aktivitas SOD \pm Std. Deviasi	
K-	5	62,05 \pm 1,376	0,000
K+	5	40,74 \pm 3,474	
P1	5	59,66 \pm 2,464	
P2	5	60,61 \pm 1,547	
P3	5	62,11 \pm 1,892	

Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 23,0 *for windows*. Analisis data dilakukan dengan metode *One Way Anova* dengan syarat sebaran data harus normal maka dilakukan uji normalitas dan varian data harus sama maka dilakukan uji homogenitas. Hasil uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai signifikan 0,21 ($p > 0,05$) artinya sebaran data dari kelima kelompok diatas normal (***lampiran 1***), sedangkan dari uji homogenitas menggunakan *Levene Statistic* didapatkan nilai signifikan 0,106 ($p > 0,05$) artinya varian data antar kelompok sama (***lampiran 1***). Berdasarkan hasil ini, maka uji *One Way Anova* dapat dilakukan. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai signifikan 0,000 ($p < 0,05$) artinya diperoleh perbedaan yang bermakna minimal antara 2 kelompok yang berbeda.



Gambar 5. 1 Hasil Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) Plasenta Tikus Bunting terhadap Pengaruh Paparan Asap Rokok dan Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

Keterangan:

- Kelompok kontrol negatif (K-): tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi.

- b. Kelompok kontrol positif (K+): dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi.
- c. Kelompok perlakuan 1 (P1): dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 7 mg/kgBB/hari.
- d. Kelompok perlakuan 2 (P2): dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 14 mg/kgBB/hari.
- e. Kelompok perlakuan 3 (P3): dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 28 mg/kgBB/hari.

Analisis berikutnya menggunakan metode *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda yaitu menggunakan uji *Tukey HSD* dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0,05$).

Tabel 5. 2 Hasil Perbandingan Antar Kelompok dengan Uji *Tukey HSD*

Kelompok	K-	K+	P1	P2	P3
K-		0,000*	0,478	0,853	1,000
K+			0,000*	0,000*	0,000*
P1				0,962	0,457
P2					0,835
P3					

$p < 0,05$ adalah bermakna (*)

Hasil dari uji tersebut disimpulkan sebagai berikut:

- a. Kelompok K+ memiliki aktivitas SOD yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan kelompok K- ($p = 0,000$).
- b. Kelompok P1, P2, P3 memiliki aktivitas SOD yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok K+ ($p = 0,000$).
- c. Kelompok P1, P2, P3 tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok K- ($p = 0,478$; $p = 0,853$; $p = 1,000$).
- d. Kelompok P1 tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok P2 ($p = 0,962$).

- e. Kelompok P2 tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok P3 ($p = 0,835$).
- f. Kelompok P3 tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok P1 ($p = 0,457$).

Selanjutnya, dilakukan uji Korelasi *Pearson* untuk mengetahui kekuatan hubungan antara 2 variabel yaitu pengaruh ekstrak etanol kulit apel manalagi terhadap aktivitas SOD plasenta tikus. Hasil yang didapatkan dari uji Korelasi *Pearson* (***lampiran 1***) sebagai berikut:

- a. Nilai korelasi $r = 0,730$ artinya terdapat korelasi yang kuat antara pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan aktivitas SOD plasenta tikus.
- b. Arah korelasi positif artinya semakin tinggi dosis ekstrak etanol kulit apel manalagi maka akan semakin tinggi juga aktivitas SOD plasenta tikus.
- c. Nilai signifikan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) artinya adanya korelasi yang signifikan antara pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan aktivitas SOD plasenta tikus.

Kemudian dilakukan uji regresi untuk mengetahui presentase aktivitas SOD plasenta tikus yang dipengaruhi oleh pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi. Hasil uji regresi (***lampiran 1***) dinyatakan dengan R^2 , nilai R^2 sebesar 0,533 yang artinya ekstrak etanol kulit apel manalagi dapat berpengaruh terhadap aktivitas SOD plasenta tikus sebesar 53,3%.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan metode penelitian *eksperimental* yang bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dalam mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok. Hasil pengukuran aktivitas SOD plasenta pada kelompok kontrol positif K+ rata-ratanya sebesar 40,74 U/100mg. Jumlah rata-rata aktivitas SOD plasenta tikus pada kelompok ini memiliki nilai yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lain, karena pada kelompok ini tikus bunting diberikan paparan asap rokok selama 13 hari. Berdasarkan analisis statistik dengan metode *Post Hoc* menggunakan uji *Tukey HSD* didapatkan kelompok kontrol positif K+ memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok K- ($p = 0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok mampu menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas SOD plasenta tikus. Penurunan aktivitas SOD plasenta ini disebabkan karena paparan asap rokok secara terus menerus. Asap rokok diketahui mengandung sekitar 3500 senyawa kimia dan sebagian besar bersifat karsinogen atau mutagen dan beracun (Valavanidis *et al.*, 2009). Paparan asap rokok dapat menyebabkan terjadinya radikal bebas. Radikal bebas ini memiliki reaktivitas (kemampuan untuk mudah menangkap dan melepas elektron) yang tinggi, hal ini disebabkan karena jumlah elektron yang tidak berpasangan sehingga akan cenderung menarik pasangan dari senyawa lain dan membentuk radikal bebas yang baru (Winarsi, 2007). Dampak negatif dari peningkatan radikal bebas dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif ini merupakan ketidakseimbangan jumlah radikal bebas berupa ROS dengan antioksidan yang

ada dalam tubuh (Hung, 2007). Resiko dari terjadinya stres oksidatif yaitu terjadinya kerusakan oksidatif. Saat hamil plasenta merupakan organ penting yang berfungsi sebagai pertukaran oksigen dan jalan masuknya nutrisi dari ibu ke janin (Sbrana, 2011). Apabila stres oksidatif terjadi pada plasenta maka akan menimbulkan terjadinya disfungsi endotel vaskular dan terjadi vasokonstriksi yang menyebabkan berkurangnya aliran darah ke plasenta (Cunningham *et al.*, 2012; Sbrana, 2011). Berdasarkan hasil penelitian oleh Amini (2013) terkait aktivitas SOD plasenta yang diberikan paparan asap rokok terbukti bahwa asap rokok mampu menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas SOD plasenta. Hasil penelitian Chaudhary *et al.* (2016) membuktikan bahwa tikus yang terpapar asap rokok akan mengalami stres oksidatif yang berakibat pada peningkatan kadar MDA (*Malondialdehyde*) dan penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*). Penurunan aktivitas SOD plasenta ini terjadi ketika paparan radikal bebas yang terus menerus dari luar tubuh sehingga menyebabkan jumlahnya masih berlebihan setelah tubuh mengeluarkan antioksidan primer SOD (*Superoksida Dismutase*) untuk menetralkan radikal bebas tersebut (Bender, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian, rata-rata aktivitas SOD plasenta tikus bunting pada kelompok K- didapatkan sebesar 62,05 U/100mg. Kelompok K- ini memiliki rata-rata aktivitas SOD plasenta tikus yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok K+. Hal ini menggambarkan kondisi normal tubuh saat hamil yang tidak mendapatkan paparan dari radikal bebas seperti asap rokok. Apabila radikal bebas masuk ke dalam tubuh, maka tubuh akan memproduksi antioksidan (Khaira, 2010). Antioksidan yang diproduksi oleh tubuh salah satunya yaitu SOD (*Superoksida Dismutase*). SOD (*Superoksida Dismutase*) akan melawan radikal bebas dengan mengkatalis superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2)

(Grigorov, 2012). Oksidan yang terbentuk (H_2O_2) diubah menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) oleh enzim katalase (CAT) atau *glutathione peroxidase* (GPx) (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Hasil uji *Tukey HSD* pada kelompok P1, P2, P3 memiliki aktivitas SOD yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K+ dengan nilai $p = 0,000$. Aktivitas SOD plasenta tikus meningkat pada kelompok P1, P2, P3 dibandingkan dengan kelompok K+ karena pemberian antioksidan dari luar tubuh yaitu ekstrak etanol kulit apel manalagi yang dapat mencegah terjadinya kerusakan oksidatif di dalam tubuh. Hal ini karena kandungan fenolik dan flavonoid paling banyak terdapat dalam kulit apel dibanding daging buah apel (Lee *et al.*, 2003). Kandungan flavonoid ini sebagai antioksidan yang mampu menghambat enzim yang terlibat dalam ROS. Flavonoid ini juga memiliki kemampuan untuk mereduksi radikal bebas seperti superoksida, peroksil, alkoksil, dan radikal hidroksi (Kumar and Pandey, 2013). Menurut Lata dan Tomala (2007) bahwa kulit apel mengandung hampir 40% flavonol, 30% askorbat, 20% total senyawaan fenolik, 14% total *glutathione*, dan 11% L-sistein. Golding *et al.* (2006) juga mengklasifikasikan fenolik dalam kulit apel atas asam fenolat/asam klorogenat, flavonoid yaitu flavan (katekin), prosianidin, flavonol (quercetin glikosida), kalkon (florelin glikosida), dan antosianin (cianidin glikosida). Mekanisme kerja flavonoid adalah akan menghambat kerja enzim yang terlibat dalam reaksi anion superoksida, dan flavonoid akan mengikat logam kelumit yang terlibat dalam reaksi yang menghasilkan radikal bebas. Flavonoid juga dapat menghentikan radikal dengan cara menyediakan sisi untuk pengikatan radikal bebas. Sisi tersebut berfungsi untuk menerima donor elektron yang baik (Lee *et al.*, 2003). Hal diatas didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Butarbutar dkk (2016) tentang

Potensi Ekstrak Etanol Daun Petai (*Parkia speciosa Hassk.*) Terhadap Kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) pada Plasma Tikus yang Mengalami Stres Oksidatif menunjukkan bahwa kandungan flavonoid pada ekstrak daun petai mampu meningkatkan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) yang mengalami stres oksidatif karena paparan asap rokok. Hasil penelitian oleh Irtanto dkk (2017) juga mendukung penelitian ini bahwa pemberian ekstrak floret pisang raja (*Musa x paradisiaca*) yang mengandung flavonoid dan fenol dapat mencegah penurunan kadar SOD pada hati mencit (*Mus musculus*) balb/c dengan aktivitas fisik berlebih. Hal ini membuktikan bahwa kandungan antioksidan berupa flavonoid dalam apel dapat menangkal radikal bebas dan mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) akibat paparan asap rokok yang terjadi secara terus menerus.

Hasil penelitian pada kelompok P1, P2, P3 ini tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok K- dengan nilai ($p = 0,478$; $p = 0,853$; $p = 1,000$). Maka dengan demikian dosis P1, P2, P3 sebesar 7 mg/kgBB, 14 mg/kgBB, 28 mg/kgBB ekstrak etanol kulit apel manalagi sebagai antioksidan eksogen dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta tikus dan mampu mengembalikan aktivitas SOD plasenta tikus dalam keadaan normal saat hamil.

Berdasarkan hasil uji *Tukey HSD* pada kelompok P1 tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok P2 ($p = 0,962$). Kelompok P2 juga tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang signifikan dengan kelompok P3 ($p = 0,835$). Kelompok (P3) tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD yang disignifikan dengan kelompok P1 ($p = 0,457$). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga dosis P1, P2, P3 tidak memiliki perbedaan yang signifikan dalam mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta tikus.

Berdasarkan hasil diatas maka ditarik kesimpulan bahwa paparan asap rokok sebagai sumber radikal bebas mampu menurunkan aktivitas SOD plasenta tikus bunting yang diukur dengan aktivitas SOD plasenta tikus. Ekstrak etanol kulit apel manalagi mengandung antioksidan dapat menekan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh terbukti dalam penelitian ini sehingga mendukung dalam pencegahan penurunan aktivitas SOD plasenta. Ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis kelompok P1 sebesar 7 mg/kgBB sudah efektif dalam mencegah penurunan aktivitas SOD dan mampu mengembalikan aktivitas SOD plasenta dalam keadaan normal saat hamil. Kelompok P2, P3 yang memiliki jumlah dosis yang lebih tinggi yaitu sebesar 14 mg/kgBB, 28 mg/kgBB juga mampu mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta yang diakibatkan oleh radikal bebas yang berasal dari asap rokok.

Hasil dari uji Korelasi *Pearson* didapatkan nilai korelasi $r = 0,730$ artinya terdapat korelasi yang kuat antara pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan aktivitas SOD plasenta tikus. Arah korelasi menunjukkan nilai positif artinya semakin tinggi dosis ekstrak etanol kulit apel manalagi maka akan semakin tinggi juga aktivitas SOD plasenta tikus. Nilai signifikan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) artinya adanya korelasi yang signifikan antara pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan aktivitas SOD plasenta tikus. Uji regresi didapatkan nilai R^2 sebesar 0,533 yang artinya ekstrak etanol kulit apel manalagi dapat berpengaruh terhadap aktivitas SOD plasenta tikus sebesar 53,3%. Sisanya sebesar 46,7% dipengaruhi oleh faktor-faktor lain dalam pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi terhadap peningkatan aktivitas SOD plasenta.

Dengan demikian berdasarkan hasil uji korelasi dan regresi yang menguatkan hasil penelitian bahwa ekstrak etanol kulit apel manalagi sebagai

antioksidan dari luar tubuh (antioksidan eksogen) mampu mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta tikus bunting akibat paparan asap rokok sebagai radikal bebas memiliki korelasi yang kuat. Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan maka hipotesis yang menyatakan ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok **terbukti**.

Keterbatasan penelitian ini yaitu ditemukannya tikus mati dalam kelompok perlakuan yang tidak bisa dikendalikan oleh peneliti.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta tikus bunting yang dipapar asap rokok. Dosis efektif dari pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi sebesar 7 mg/kgBB yang dapat berpengaruh dalam mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta tikus.

7.2 Saran

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut terkait pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi untuk mengetahui dosis yang lebih rendah dari dosis 7 mg/kgBB yang dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas dan uji teratogenitas dari ekstrak etanol kulit apel manalagi.
3. Diperlukan pengembangan lebih lanjut terkait ekstrak etanol kulit apel sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas dari luar tubuh sehingga penelitian ini nantinya dapat dirasakan manfaatnya oleh masyarakat khususnya bagi ibu hamil contohnya dalam bentuk minuman.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandru, I. Experimental Use of Animals in Research Spa. *Balneo Research Journal*. 2011. 2 (1): 65-69.
- Ambrose JA, Barua RS. The Pathophysiology Of Cigarette Smoking And Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004. 43 (10): 1731-1737.
- Amini G A L. 2013. Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Plasenta Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok Subakut. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Anggraini, Dewi. 2017. *Jus Apel Manalagi (Malus Sylvestris Mill) Menghambat Pertumbuhan Streptococcus Mutans In Vitro*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Denpasar.
- Ardie, Ari Muhandri. Radikal Bebas dan Peran Antioksidan dalam Mencegah Penuaan. *Medicinus Scientific Journal of Pharmaleutical Development and Medical Application*. 2011. 24 (1): 4-9.
- Bender DA. 2009. *Free Radicals an Antioxidant Nutrients*. Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill Lange. p. 482.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., 2011. *USDA Database for the Flavonoid Contents of Selected Foods*, U.S. Department of Agriculture, Belytsville, p. 21-22.
- Bhattacharya, Susinjan. 2015. *Reactive Oxygen Species and Cellular Defence System in Free Radicals in Human Health and Disease*. p. 17-28.
- Boyer J, and Liu RH. Apple Phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*. 2004. 3:5.
- Butarbutar, Ruth Haryati, Robiyanto, Eka Kartika Untari. Potensi Ekstrak Etanol Daun Petai (*Parkia speciosa Hassk.*) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Pada Plasma Tikus yang Mengalami Stres Oksidatif. *Pharm Sci Res*. 2016. 3 (2): 97-106.
- Cempaka, Anggun Rindang., Sanarto Santoso, Laksmi Karunia Tanuwijaya. Pengaruh Metode Pengolahan (Juicing dan Blending) terhadap Kandungan Quercetin Berbagai Varietas Apel Lokal dan Impor (*Malus domestica*). *Indonesian Journal of Human Nutrition*. 2014. 1 (1): 14-22.

- Chaudhary, Janardan, Royana Singh , SN Shamal, K Supriya, Mona Srivastava, RS More. Effect of Tocopheryl Acetate on Maternal Cigarette Smoke Exposed Swiss Albino Mice Inbred Fetus. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016, 10 (10): AC01-AC05.
- Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical scavenging activities of peels and pulp from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem*. 2004. 52 (15): 4684-4689.
- Clark KE and Irion GL. Fetal Hemodynamic Response To Maternal Intravenous Nicotine Administration. *Am J Obstet Gynecol*. 1992. 167 (6):1624-1631.
- Costa V, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. Mitochondrial Superoxide Dismutase Is Essential of Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* In The Post Diauxic Phase. *Microbiol*. 1997. 143:1649-1956.
- Cunningham, F. G. 2012. *Obstetri Williams*. Jakarta: EGC.
- Deshpande, S. S., P. Angkeow, J. Huang, M. Ozaki and K. Irani. Inhibits TNF- α -Induced Endothelial Cell Apoptosis: Dual Regulation by Reactive Oxygen Species. *The FASEB*. 2000. 14: 1705-1714.
- Economides D and Braithwaite J. Smoking, Pregnancy And The Fetus. *JR Soc Health*. 1994. 11 (4): 198-201.
- Fukumoto LR and Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000. 48 (8): 3597-3604.
- Golding JB, McGlasson WB, Wyllie SG, Leach DN. Fate of apple peel phenolics during cold storage. *J Agric Food Chem*. 2001. 49(5): 2283-2289.
- Grigorov B., Reactive Oxygen Species and Their Relation to Carcinogenesis. *Trakia Journal of Sciences*. 2012. 3 (10): 88-92.
- Hayfaa AW, Rasmieh AA, Amel AF, Ahmed M, Ghadeer A, Samia AE. Effects of secondhand smoke on the birth weight of term infants and the demographic profile of saudi exposed woman. *BMC Public Health*. 2013. 13 (341): 1471-2458.
- Hung, Jeng-Hsui. Oxidative Stress and Antioxidants in Preeclamsia. *J Chin Med Assoc*. 2007. 70 (10): 430-432.
- Irtanto, Okky, Alex Pangkahila, IGM Aman. Pemberian Ekstrak Floret Pisang Raja (*Musa x paradisiaca*) Mencegah Penurunan Kadar Superoksida Dismutase

- (SOD) pada Hati Mencit (*Mus musculus*) BALB/c dengan Aktivitas Fisik Berlebih. *Jurnal Biomedik (JBM)*, 2017, 9 (3):166-171.
- Kemenkes RI. 2015. *Infodatin Perilaku Merokok Masyarakat Indonesia*. Jakarta, hal 2-10.
- Kevin C, Kregel, Hannah J, Zhang. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects and pathological considerations. *Am J Physiol*. 2006. 292: 18-36
- Khaira, Kuntum. Menangkal Radikal Bebas dengan Anti-Oksidan. *Jurnal Sainstek*. 2010. 2 (11): 183-187.
- Kohen, R., Nyska, A., Oxidation of Biological System: Oxidative Stress Phenomen, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicology Pathology*. 2002. 30 (6): 620-650.
- Kumar, Shashank and Pandey, Abhay, K., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013. 10: 1155.
- Lankhanpal P and Rai DK, *Quercetin: A Versatile Flavonoid*. Internet Journal of Medical Update. 2007. 2 (2).
- Lata B, Tomala K. Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compound. Cultivar and year implication. *J Agric Food Chem*. 200. 55(26): 10795-10802.
- Laurence, D.R., and A.L., Bacharach., 1964, Evaluation of drug activities: pharmacometrics, 1st ed. Academic Press. London.
- Lee KW, Kim YJ, Kim D, Lee HJ, Lee CY. Major Phenolics in Apple and Their Contribution to The Total Antioxidant Capacity. *J Agri Food Chem*. 2003. 51 (22): 609-614.
- Legowo, Gbeavani. Manfaat Madu sebagai Antioksidan dalam Melawan Radikal Bebas dari Asap rokok untuk Menjaga Kualitas Sperma. *Majurity*. 2015. 4 (8): 41-46
- Lobo V, A Patil, A. Phatak and N. Chandra. Free Radicals, Antioxidants And Functional Foods: Impact On Human Health. *Pharmacogn Rev*. 2010. 4 (8): 118-126.
- Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent Of Nicotine And Cotinine Transfer To The Human Fetus, Placenta And Amniotic Fluid Of Smoking Mothers. *Dev Pharmacol Ther*. 1985. 8 (6): 384-95.

- Macleon DD, Murr DP, DeEll JR, Horvath CR. Proharvest variation in apple (*malus x domestica* Borkh.) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. *J Agric Food Chem*. 2006. 54(3): 870-878.
- Malole MBM dan Pramonk CSU. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Margantan, A., 2001. *Banyak Makanan Berkhasiat Obat*. Solo: CV. Aneka.
- Marks, Dawn B. Allan D. Marks, Colleen M Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta: EGC.
- Menvielle-Bourg FJ. Superoxide Dismutase (SOD), A Powerful Antioxidant, Is Now Available Orally. *Phytotherapie*. 2005. 3: 1-4.
- Mianti Mandira. 2010. *Pengelolaan Budidaya Apel di Kusuma Agrowisata*, Malang, Jawa Timur.
- Miwa, S., Muller, F.L., and Beckman, K.B. 2008. The Basics of Oxidative Biochemistry, Oxidative Stress in Aging From Model Systems to Human Diseases. Humana Press.
- Moritsugu, K. P. The Report of the Surgeon General: The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke. *American J. Prev. Med*. 2006. 32 (6): 542-543.
- Murray RK *et al.*, 2003. *Biokimia Harper*. Jakarta: Erlangga.
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 81 Tahun 1999 tentang *Pengamanan Rokok bagi Kesehatan*.
- Peraturan Pemerintahan Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012 tentang *Pengamanan Bahan yang Mengandung Zat Adiktif Berupa Produk Tembakau bagi Kesehatan*.
- Pham-Huy, Lien Ai., Hua He, Chuong Pham-Huy, C. Free Radical, Antioxidants In Disease And Health. *International Journal Of Biomed Science*. 2008. 4 (2): 86-86-96.
- Pietta G. *Flavonoids as antioxidant*. *J Nat Prod*. 2000. 63 (7): 1035 -1042.
- Sa'adah, Lailufary I. N. dan Estiasih, Teti. *Karakterisasi Minuman Sari Apel Produksi Skala Mikro dan Kecil di Kota Batu: Kajian Pustaka*. Jurnal Pangan dan Agroindustri. 2015. 3 (2): 374-380.
- Samsuria. 2009. *Efek Asap Rokok pada Tikus Rattus novergicus Bunting terhadap Tampilan Fisiologi Induk dan Anaknya Setelah Dilahirkan*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Sbrana, E. Maternal Tobacco Use is Associated with Increased Markers of Oxidative Stress in Placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 2011. p. 205-246.
- Sitepoe, M. 2000. Kekhususan Rokok Indonesia. Jakarta: PT. Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Smith John B dan Mangkoewidjojo Soesanto. *Pemeliharaan, Pembiakan Dan Penggunaan Heean Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta:Universitas Indonesia Salemba. 1988. 4: 37-48.
- Solimun. 2001. *Metodologi Penelitian Kuantitatif*. Bandung: Penerbit Alfabeta.
- Subagyo, P., Zubaidi Achmad. *Pemungutan Pektin Kulit dan Ampas Apel secara Ekstraksi. Ekspergi*. 2010. 10 (2):47-51.
- Sufrida, Irlansyah, dkk. 2004. *Khasiat dan Manfaat Apel*, Jakata Selatan: AgroMedia,
- Sukra Y. 1999. *Wawasan Ilmu Pengetahuan Embrio. Benih Masa Depan Direktorat Jenderal Pendidikam Tinggi Departemen Pendidikan Nasional*.
- Suparmi, Khusnul K, Amal F. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Apel (Pyrus malus, L) Terhadap Penurunan Permeabilitas Vaskuler pada Mencit PutihJantan Strain Balb/C, Eksakta: Jurnal Ilmu-ilmu MIPA*. 2014. p. 14.
- Supono. *Ilmu Kebidanan: Bab I Fisiologi. Unit Obstetri dan Ginekologi Rumah Sakit Umum Palembang*, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. 1985. 45-47.
- Syahdrajat T. *Merokok dan Masalahnya*. Dexa Media. 2007. 4 (20): 184-187.
- Taghavi, Sarah, Zahra Khashyarmansh, Hamideh M, Hooriyeh N, Pyman Eshraghi, Navid Jalali, Mohammad H. Nicotie Content of Domestic Cigarettes, Imported Cigarettes and Pipe Tobacco In Iron. *Addict and Health*. 2012. 4 (1-2): 28-35.
- Turner dan Bagnara. 1976. *Endokrinologi Umum Terjemahan dari General Endrocrinology*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Untung. 2006. *Apel: Janis dan Budidayanya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Valavanidis A, Thomais Vlachogianni and Kostantinos Fiotakis. Tobacco Smoke: Involvement of ROS and Stable Free Radicals In Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effect With Other Respirable Partikel. *Int J Environ Res Public Health*. 2009. 6: 445-462.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. *Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Inter J Biochem Cell Biol*. 2007. 39: 44-48.
- Warnakulasuriya S., Dietrich T., Bornstein M., Peidró E., Preshaw P., Walter C., Wennström J., and Bergström J. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *International Dental Journal*. 2010. 60:7-30.
- Werdhasari, A. Peran Anti Oksidan Bagi Kesehatan. Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes Kemenkes RI. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 2014. 3 (2): 59-68.
- WHO (World Health Organisation). 2011. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco (Online). (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44616/9789240687813_eng.pdf;jsessionid=22EA8AD0E66374774F9C85DD7B0DB4BF?sequence=1, diakses 22 Agustus 2018).
- Wickstrom R. Effects Nicotine during pregnancy: Human and Experimental Evidence. *Curret Neuropharmacology*. 2007. 5 (3): 213-222.
- Widayati, Eni. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. *Jurnal Majalah Ilmiah Sultan Agung*. 2012. 50 (128).
- Winarsi. Heri. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Yogyakarta: Kanisius.
- Wolfe K and Liu RH. Antioxidant activity of apple peel. *J Agri Food Chem*. 2003. 51(3): 609-614.
- Wolfensohn, S. Dan Lloyd, M. 2013. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. *Edisi ke 4. Wiley-Blackwell*, New Delhi.
- Wresdiyati T, Lelana RPA, Adnyane IKM, Noor K. Immunohistochemical Study of Superoxide Dismutase In The Liver of Alloxan Diabetes Mellitus Macaques. *Hayati J Bio*. 2003. 10 (2):61-65.
- Ziech, D., R. Franco *et al.*, Reactive Oxygen Species (ROS) – Induced Genetic and Epigenetic, Alterations in Human Carcinogenesis. *Mutation Research*. 2011. 711: 167-173.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Hasil Analisis Data

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
SOD	.153	25	.132	.947	25	.210

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

SOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.196	4	20	.106

3. Uji One Way Anova

ANOVA

SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1680.898	4	420.225	80.806	.000
Within Groups	104.008	20	5.200		
Total	1784.906	24			

4. Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SOD

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	21.3154*	1.44227	.000	16.9996	25.6312
	P1	2.3964	1.44227	.478	-1.9194	6.7122
	P2	1.4414	1.44227	.853	-2.8744	5.7572
	P3	-.0544	1.44227	1.000	-4.3702	4.2614
K Pos	K Neg	-21.3154*	1.44227	.000	-25.6312	-16.9996
	P1	-18.9190*	1.44227	.000	-23.2348	-14.6032
	P2	-19.8740*	1.44227	.000	-24.1898	-15.5582
	P3	-21.3698*	1.44227	.000	-25.6856	-17.0540
P1	K Neg	-2.3964	1.44227	.478	-6.7122	1.9194
	K Pos	18.9190*	1.44227	.000	14.6032	23.2348
	P2	-.9550	1.44227	.962	-5.2708	3.3608
	P3	-2.4508	1.44227	.457	-6.7666	1.8650
P2	K Neg	-1.4414	1.44227	.853	-5.7572	2.8744
	K Pos	19.8740*	1.44227	.000	15.5582	24.1898
	P1	.9550	1.44227	.962	-3.3608	5.2708
	P3	-1.4958	1.44227	.835	-5.8116	2.8200
P3	K Neg	.0544	1.44227	1.000	-4.2614	4.3702
	K Pos	21.3698*	1.44227	.000	17.0540	25.6856
	P1	2.4508	1.44227	.457	-1.8650	6.7666
	P2	1.4958	1.44227	.835	-2.8200	5.8116

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

SOD

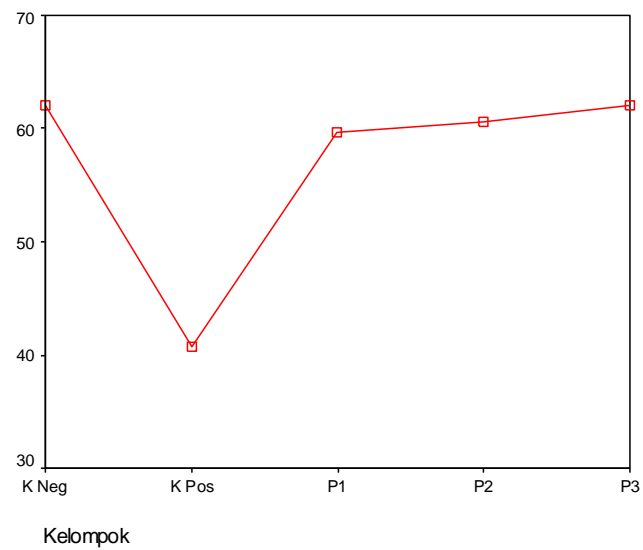
Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
K Pos	5	40.7386	
P1	5		59.6576
P2	5		60.6126
K Neg	5		62.0540
P3	5		62.1084
Sig.		1.000	.457

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Means Plots



5. Uji Regresi Linier

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.730 ^a	.533	.507	6.48449

a. Predictors: (Constant), Dosis

6. Uji Korelasi Pearson

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	48.007	2.246		21.372	.000
	Dosis	.317	.070	.730	4.530	.000

a. Dependent Variable: SOD

7. Keterangan Standar Deviasi

Descriptives

SOD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K Neg	5	62.0540	1.37595	.61534	60.3455	63.7625	60.45	63.96
K Pos	5	40.7386	3.47368	1.55348	36.4255	45.0517	36.49	45.50
P1	5	59.6576	2.46356	1.10174	56.5987	62.7165	57.03	62.52
P2	5	60.6126	1.54652	.69163	58.6923	62.5329	58.83	62.16
P3	5	62.1084	1.89245	.84633	59.7586	64.4582	59.73	63.96
Total	25	57.0342	8.62387	1.72477	53.4745	60.5940	36.49	63.96

Lampiran 2

Hasil Pengukuran Aktivitas SOD Plasenta

Kode Tikus	Abs SOD	Aktivitas SOD (unit/100mg)
Kontrol Negatif	0,171	60,45
Kontrol Negatif	0,163	61,171
Kontrol Negatif	0,155	61,892
Kontrol Negatif	0,132	63,964
Kontrol Negatif	0,145	62,793
Rata-rata	0,1532	62,054
Kontrol Positif	0,437	36,486
Kontrol Positif	0,367	42,793
Kontrol Positif	0,337	45,495
Kontrol Positif	0,402	39,64
Kontrol Positif	0,406	39,279
Rata-rata	0,3898	40,7386
Perlakuan 1	0,148	62,523
Perlakuan 1	0,209	57,027
Perlakuan 1	0,207	57,207
Perlakuan 1	0,174	60,18
Perlakuan 1	0,161	61,351
Rata-rata	0,1798	59,6576
Perlakuan 2	0,152	62,162
Perlakuan 2	0,189	58,829
Perlakuan 2	0,166	60,901
Perlakuan 2	0,185	59,189
Perlakuan 2	0,154	61,982
Rata-rata	0,1692	60,6126
Perlakuan 3	0,135	63,694
Perlakuan 3	0,179	59,73
Perlakuan 3	0,147	62,613
Perlakuan 3	0,17	60,541
Perlakuan 3	0,132	63,964
Rata-rata	0,1526	62,1084

Lampiran 3

SURAT KETERANGAN KELAIKAN ETIK



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 235 / EC / KEPK – S1– KB / 10 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,
SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,
DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dalam Mencegah Peningkatan Jumlah Leukosit, Kadar Serum LDL (*Low Density Lipoprotein*), Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Plasenta, Mencegah Penurunan Berat Plasenta, Hemoglobin (Hb), Aktivitas SOD (*Superoksida Dismute*) Plasenta, dan terhadap Berat Badan Bayi Baru Lahir (BBL) Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting akibat Paparan Asap Rokok.

PENELITI : 1. Ziana Zain Nurfadhilah 5. Retno Rahma Dila
2. Nadya Mufty Ramadhani 6. Nova Dewi Kusuma Hapsari
3. Fathan Hayati 7. Meiristya Abir Putri Kharima
4. Khalisa Erwanto

UNIT / LEMBAGA : S1 Kebidanan – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr. dr. Moch Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIK. 160746683

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy.
Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 4

Dokumentasi Penelitian



Pembedahan Tikus



Pemberian ketamine



Pemberian ekstrak dengan sonde



Pemaparan Asap Rokok



Pengukuran SOD plasenta dengan Spektrofotometer



Plasenta yang sudah dilarutkan



Penggerusan plasenta



Penyimpanan plasenta



Pengenceran ekstrak



Aklimatisasi tikus dan penomoran tikus